



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/56, 15/82, 9/24 C12N 5/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/01792 (43) Date de publication internationale: 6 février 1992 (06.02.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00607 (22) Date de dépôt international: 24 juillet 1991 (24.07.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/09460 24 juillet 1990 (24.07.90) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): SANOFI [FR/FR]; 40, avenue George-V, F-75008 Paris (FR). SOCIÉTÉ NATIONALE ELF AQUITAINE [FR/FR]; Tour Elf, 2, place de la Coupole, La Défense 6, F-92400 Courbevoie (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DUBOIS, Michel [FR/FR]; 29, rue Hector-Berlioz, Res-Hautpré, F-78530 Buc (FR). GRISON, René [FR/FR]; 13, rue de Nauvouze, F-31750 Escalquens (FR). LEGUAY, Jean-Jacques [FR/FR]; 3, allée des Fiacres, F-31320 Auzeville-Tolosane (FR). PIGNARD, Annie [FR/FR]; 3, rue du Canigou, F-31120 Roquettes (FR). TOPPAN, Alain [FR/FR]; 2, rue de Crabinet, F-31700 Comebarrieu (FR).		(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc. ; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: RECOMBINANT GENE CODING FOR A PROTEIN HAVING AN ENDOCHITINASE ACTIVITY		
(54) Titre: GENE RECOMBINANT CODANT POUR UNE PROTEINE A ACTIVITE ENDOCHITINASE		
<p>Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met Leu Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg Ser Phe Pro Gly Phe Gly Thr Ser Gly Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe Ala Gln Thr Ser His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp Gly Pro Phe Ala Trp Gly Tyr Cys Phe Leu Arg Gly Arg Gly Asn Pro Gly Asp Tyr Cys Ser Pro Ser Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro Ile Gln Ile Ser His Asn Tyr Asn Tyr Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser (I) Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Ile Gly Arg Trp Asn Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ala Asn Arg Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly Arg Gly Asn Asp Asn Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp Cys Gly Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met.</p>		
(57) Abstract		
Recombinant gene coding for a protein with endochitinase activity and/or lysozyme activity, which comprises the following sequence (I): . Application: production of plants resisting to pathogenic agents.		
(57) Abrégé		
Gène recombinant codant pour une protéine à activité endochitinase et/ou activité lysozyme qui comprend la séquence (I). Application: obtention de plantes résistantes aux agents pathogènes.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

⁺ On ignore encore pour quels Etats de l'ancienne Union soviétique une désignation de l'Union soviétique déploie ses effets.

Gène recombinant codant pour une protéine à activité endochitinase

L'invention concerne un nouveau gène recombinant codant pour une nouvelle protéine à activité endochitinase ou pour un pré-
05 curseur de cette dernière, une bactérie contenant ce gène recombinant, une cellule végétale, une plante, ou une partie de plante, en particulier une semence végétale, qui contiennent un gène recombinant de ce type, un procédé pour rendre les plantes résistantes aux agents pathogènes, tels que les champignons, les bactéries,
10 ainsi que les arthropodes notamment les insectes, et les nématodes, qui comprend une étape de transformation par ce gène, ainsi que cette nouvelle protéine et un procédé pour la préparer.

Les plantes cultivées sont soumises à des attaques par des agents pathogènes, tels que les champignons et les bactéries,
15 lesquelles sont responsables de pertes importantes de récoltes. Le principal moyen actuel de lutte contre ces agents réside dans l'utilisation de substances chimiques à activité fongicide ou bactéricide. On sait aujourd'hui que les plantes réagissent naturellement à ces attaques par divers mécanismes de défense, malheureusement en général à déclenchement trop tardif et d'intensité
20 trop faible pour être suffisamment efficaces. L'un de ces mécanismes comprend l'induction d'une enzyme appelée chitinase EC 3.2.1.14. (A. Toppan et al., 1982, Agronomie, 2, 829-834). Cette induction peut être artificiellement stimulée par des substances,
25 telles que l'éthylène avec comme conséquence l'augmentation de la résistance aux agents pathogènes de la plante traitée (Boller T., 1988, Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, 5, 145-174).

La chitine est un polymère linéaire polysaccharidique,
30 constitué d'unités N-acétylglucosamine associées par des liaisons β -1,4. Celui-ci est un composé structural présent dans la paroi de la plupart des champignons pathogènes, dans l'exosquelette des arthropodes, en particulier des insectes, et dans l'enveloppe externe des oeufs et des cystes de nématodes. Les enzymes appelées
35 chitinases sont capables de dégrader la chitine. On distingue parmi celles-ci deux groupes différents définis selon leur mode d'attaque

de la chitine : les exochitinases capables de libérer l'unité N-acétylglucosamine située aux extrémités non réductrices des chaînes et les endochitinases capables de fragmenter les chaînes, qui sont les seules chitinases capables d'inhiber in vitro la croissance des
05 hyphes mycéliennes (Roberts W.K. et al., 1988, Gen. Microbiol, 134, 169-176). Les chitinases végétales connues sont en grande majorité de type endo, contrairement aux chitinases bactériennes connues qui sont de type exo (Roberts W.K et al., 1988, Gen. Microbiol, 134, 169-176).

10 Un grand nombre d'endochitinases végétales, notamment celles de tomate et de tabac (P. AUDY et al., 1990, Phytochem, 29, 4, 1143-1159), présentent également une activité lysozyme, capacité de cliver les liaisons β -1,4 entre la N-acétylglucosamine et
15 l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane des parois bactériennes. On peut donc admettre que les activités lysozyme et endochitinase sont assez proches (Roberts W.K et al., 1988, Gen. Microbiol., 134, 169-176) et qu'une nouvelle protéine à activité endochitinase, en particulier de structure intermédiaire entre l'endochitinase de tomate et l'endochitinase de tabac, présente
20 probablement une activité lysozyme.

Des séquences d'ADN codant pour des exochitinases bactériennes ont déjà été isolées et clonées (Jones J.D.G. et al., 1986 EMBO J., 5, 467-473 et Sundheim L. et al., 1988, Physiol. Molec. Plant Pathol., 33, 483-491). Le brevet US-A-4751081 décrit l'isole-
25 ment et le clonage du gène complet codant pour la chitinase de Serratia marcescens ainsi que la transformation par ce gène des bactéries Pseudomonas fluorescens NZ130 et Pseudomonas putida MK280. Ces bactéries transformées sont capables de dégrader légèrement une chitine colloïdale dispersée dans le milieu de culture
30 bactérien. Les travaux de Harpster M.H. et al, 1989, Nucl. Ac. Res., 17, 5395 ont montré que ce gène code pour une exochitinase, ce qui explique la faible efficacité de dégradation observée (Cf. tableau 2, col. 13 et 14 de ce document). La publication de Jones J.D.G. et al. (1988), Mol. Gen. Genet., 212, 536-542,
35 mentionne la transformation de plantes de tabac par Agrobacterium tumefaciens contenant un gène chimérique comprenant la partie

codante de l'exochitinase de Serratia marcescens, sous contrôle de différents promoteurs végétaux. Ce document ne donne aucune indication sur l'éventuelle augmentation de la résistance aux pathogènes conférée par l'expression de cette exochitinase.

05 Des séquences d'ADN génomique et/ou d'ADN complémentaire codant pour certaines endochitinases végétales ont d'autre part été isolées et clonées (Broglie K.E., 1986, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 83, 6820-6824 et Hedrick S.A., 1988, Plant Physiol., 86, 182-186).

10 La demande de brevet WO 90/07001 décrit la construction d'un plasmide portant un ADN complémentaire de l'endochitinase de haricot Phaseolus vulgaris sous le contrôle d'un promoteur fort, la transformation à l'aide d'Agrobacterium tumefaciens, la régénération du tabac transformé, des essais montrant la résistance accrue aux champignons, Rhizoctonia solani et Botrytis cinerea des
15 plantes régénérées, l'obtention de plantes de tomates transgéniques exprimant la chitinase de haricot ainsi que l'obtention à l'aide de ce gène de plantes de colza transgéniques ayant un niveau d'activité chitinase et une résistance à Rhizoctonia solani accrues par rapport aux plantes de colza non transformées.

20 L'invention concerne donc un nouveau gène recombinant caractérisé en ce qu'il code pour une protéine à activité endochitinase ou un précurseur de cette dernière, qui comprend la séquence (1) ci-après (SEQ ID NO : 1) :

25 Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met Leu
Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr Ser Tyr
Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg Ser Phe Pro Gly Phe Gly Thr Ser Gly
Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe Ala Gln Thr Ser
His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp Gly Pro Phe Ala Trp
30 Gly Tyr Cys Phe Leu Arg Glu Arg Gly Asn Pro Gly Asp Tyr Cys Ser Pro
Ser Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro
Ile Gln Ile Ser His Asn Tyr Asn Tyr Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly
Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser
Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser
35 Cys His Asp Val Ile Ile Gly Arg Trp Asn Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser
Ala Asn Arg Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly

Leu Glu Cys Gly Arg Gly Asn Asp Asn Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe
 Tyr Arg Arg Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp
 Cys Gly Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

05 Ce gène recombinant code de préférence pour une protéine
 qui comprend, immédiatement en amont de la séquence (1), la
 séquence (2) ci-après (SEQ ID NO : 2) :

Gln Asn Cys Gly Ser Gln Gly Gly Gly Lys Val Cys Ala Ser Gly Gln Cys
 Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly Asn Thr Asn Asp His Cys Gly Ser Gly
 10 Asn Cys Gln Ser Gln Cys Pro Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro Val Thr

destinée à être clivée lors de la maturation de la protéine, ou une
 séquence présentant un degré d'homologie substantiel avec la
 séquence (2).

15 De préférence, ce gène recombinant code pour une protéine
 dont la séquence comprend, en amont de la séquence (1) et de préfé-
 rence séparée de la séquence (1) par une séquence destinée à être
 clivée, une séquence codant pour un peptide-signal. Un gène de ce
 type particulièrement intéressant est celui qui code pour une pro-
 20 téine dont la séquence comprend, immédiatement en amont de la
 séquence (2) ou d'une séquence présentant un degré d'homologie
 substantiel avec la séquence (2), la séquence (3) ci-après (SEQ ID
 NO : 3) :

25 Met Arg Arg Thr Ser Lys leu Thr Thr Phe Ser Leu Leu Phe Ser Leu Val
 Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ala

ou une séquence présentant un degré d'homologie substantiel avec la
 séquence (3).

30 L'invention concerne aussi un gène recombinant codant
 pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de
 cette dernière, qui comprend une séquence présentant un degré
 d'homologie substantiel avec la séquence (1). La partie codante de
 ce gène recombinant comprend au moins une partie 5' de l'ADN géo-
 35 mique ou de l'ADN complémentaire de l'endochitinase de tomate et au
 moins une partie 3' de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire

de l'endochitinase de tabac. De préférence, la partie codante du gène recombinant présente au moins un intron. En effet, il est connu que la présence d'introns dans la partie codante d'un gène augmente l'expression de celui-ci (voir par exemple les travaux de
05 J. CALLIS et al., (1987, Genes and development, 1, 1183-1200).

Un exemple de tel gène recombinant est le gène recombinant dont la partie codante est la séquence ci-après (SEQ ID NO : 4) :

```

10  ATGAGGCGAA CTTCTAAATT GACTACTTTT TCTTTGCTGT TTTCTCTGGT
    TTTGCTGAGT GCTGCCTTGG CACAGAATTG TGCTTCACAG GGCGGAGGCA
    AAGTTTGTGC GTCGGGACAA TGTTCGAGCA AATTCGGGTG GTCCGGTAAC
    ACTAATGACC ATTGTGGTTC TGGCAATTGT CAAAGTCAGT GTCCAGGTGG
15  CGGCCCTGGT CCTGGTCCTG TTA CTGGTGG GGACCTCGGA AGCCTCATCT
    CAAATTCTAT GTTTGATCAA ATGCTTAAGC ATCSTAACGA AAATTCTTGT
    CAAGGAAAGA ATAATTTCTA CAGTTACAAT GCCTTTATTA CTGCTGCTAG
    GTCTTTTCCT GGCTTTGGTA CAAGTGGTGA TATCAATGCC CGTAAAAGGG
20  AAATTGCTGC TTTCTTTGCC CAAACCTCCC ATGAAACTAC TGGTATGTGT
    ATAACCATTC ACATCGAACC ATTAATAATAT AATTTCAATT TATTTTATTT
    AGTAATTGAT TATATATGTA GGAGGATGGC CTTCCGCAAC TGATGGACCA
    TTCGCATGGG GTTACTGTTT CCTTAGAGAA CGAGGTAACC CCGGTGACTA
25  CTGTTTACCA AGTAGTCAAT GGCCTTGTGC ACCTGGAAGG AAATATTTCC
    GACGAGGCCC AATCCAAATT TCACAGTAAG CTACATAAAT CTATATATGG
    TAAAATTTGA TGAACCTGTA GTGTCTAATT ACGTGTATTT TGACATTTCA
30  AAACAGCAAC TACAACATAT GCCCATGTGG AAGAGCCATC GGAGTGGACC
    TTTTAAACAA TCCTGATTTA GTAGCCACAG ACCCAGTCAT CTCATTCAAG
    ACTGCTATCT GGTTCCTGGAT GACCCCTCAA TCACCAAAGC CTTCTTGCCA
    CGATGTCATC ATTGGAAGAT GGAACCCATC TGCCGGTGCAC CGATCAGCCA

```

ATCGTCTTCC TGGATTTGGT GTCATCACAA ACATCATCAA TGGGGGCCTG
GAATGTGGTC GTGGCAATGA CAATAGGGTC CAGGATCGCA TTGGGTTTTA
CAGGAGGTAT TCGGGTATTC TTGGTGTTAG TCCTGGTGAC AATCTTGATT
05 GCGGAAACCA GAGATCTTTT GGAAACGGAC TTTTAGTCGA TACTATGTAA
TGA

Cette séquence codante est, de préférence, précédée d'une
10 séquence promotrice comportant un promoteur viral fort, tel que le
promoteur 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur [voir
ODELL J.T. et al., 1985, NATURE, 313, 810-812] et suivie d'une
séquence terminatrice comportant le terminateur de la nopaline
synthase d'Agrobacterium tumefaciens [voir BEVAN M. et al., 1983,
15 Nucl. Ac. Res., 11, 369].

L'invention a également trait à une bactérie, par exemple
de l'espèce E. coli, qui contient le gène recombinant défini ci-
dessus dans un contexte ou environnement nucléotidique permettant
sa répllication et donc peut servir au clonage de ce gène, ainsi
20 qu'à une bactérie susceptible d'infecter une plante avec transfert
de matériel génétique, par exemple de l'une des espèces Agro-
bacterium rhizogenes et Agrobacterium tumefaciens, qui contient ce
gène dans un contexte permettant sa répllication et donc peut servir
à transformer des cellules végétales. La transformation des cel-
25 lules végétales par le gène ci-dessus peut également être effectuée
par une autre méthode biologique telle que la voie du tube polli-
nique (Zhong-xun Luo et al., Plant Molec. Biol. Rep., 1988, 6, 165-
176) et la transformation directe de graines en germination
(Toepfer R. et al., 1989, The Plant Cell., 1, 133-139), ou par une
30 méthode physique telle que l'utilisation de polyéthylèneglycol,
l'électroporation (Chistou P. et al., 1987, Proc. Ntl. Acad. Sci.
USA, 84, 3662-3699) et le bombardement à l'aide de microprojectiles
(Klein T.M. et al., 1988, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 85, 8502-
8505).

35 L'invention concerne également une cellule végétale
caractérisée en ce qu'elle est transformée par le gène recombinant

défini ci-dessus, inséré dans un contexte susceptible de permettre son expression. Cette cellule végétale peut provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, la betterave, le blé, l'orge, le pavot, le colza, le tournesol, la luzerne et le sorgho, d'une espèce florale telle que le rosier, l'oeillet, le gerbera ou d'une espèce potagère telle que la carotte, la tomate, la salade, la chicorée, le poivron, le melon et le chou. Des espèces particulièrement appréciées sont le colza Brassica napus, le tournesol Helianthus annuus et le tabac Nicotiana tabacum.

L'étape de transformation qui concerne une ou quelques cellules est suivie d'une étape de multiplication de ces cellules transformées de façon à obtenir des cals, lesquels peuvent donner naissance à des plantes transformées, par des processus d'organogenèse ou d'embryogenèse. Une partie des descendances de ces plantes transformées contient et exprime le gène recombinant.

L'invention concerne donc aussi une plante ou une partie de plante, caractérisée en ce qu'elle contient, dans un contexte susceptible de permettre son expression, le gène recombinant défini ci-dessus. Une partie de plante particulièrement appréciée est la semence : graine ou autre partie d'un végétal apte à former une nouvelle plante complète, notamment après semi ou enfouissement. Ces plantes peuvent être l'une quelconque des espèces ci-dessus et plus particulièrement des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

L'invention a également trait à un procédé pour obtenir des plantes résistantes aux agents pathogènes, tels que les champignons, les bactéries ainsi que les arthropodes, en particulier les insectes, et les nématodes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de transformation de cellules végétales par le gène recombinant défini ci-dessus, suivie d'une étape de multiplication des cellules transformées et d'une étape de régénération des plantes.

De préférence, l'étape de transformation des cellules végétales est effectuée in vitro à l'aide d'une agrobactérie

(c'est-à-dire d'une bactérie du genre Agrobacterium) ayant intégré le gène recombinant défini ci-dessus.

05 L'invention concerne aussi les plantes résistantes aux agents pathogènes susceptibles d'être obtenues à l'aide du procédé défini ci-dessus.

L'invention a également trait à l'utilisation d'une plante faisant partie des plantes définies au paragraphe précédent ou d'une plante contenant, dans un contexte susceptible de permettre son expression, le gène recombinant défini précédemment,
10 comme géniteur dans un programme de sélection pour créer de nouvelles variétés végétales.

L'invention concerne aussi une nouvelle protéine à activité endochitinase qui comprend la séquence (1) ainsi qu'un procédé pour l'obtenir qui comprend la mise en culture de cellules ou de
15 cals végétaux transformés par le gène recombinant, la lyse de ceux-ci, l'isolement et la purification de la protéine recombinante. Cette protéine peut présenter un intérêt comme principe actif d'un nouveau médicament destiné à soigner des affections, telles que par exemple les mycoses.

20 L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples ci-après :

une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme de l'art, est exposée en détail dans l'ouvrage de Maniatis et al. : "Molecular cloning : a laboratory
25 manual" publié en 1989 par les éditions Cold Spring Harbor Press à New York (2^e édition).

Le matériel biologique (souches, phages, plasmides ou plantes) utilisé dans les exemples ci-après est disponible dans le commerce et décrit respectivement dans les documents ci-après :

30

- | | |
|----------------------------|--|
| - phage Lambda CHARON 4A : | MANIATIS et al., Op. Cit. ; |
| - vecteur binaire pBIN19 : | BEVAN et al., 1984, Nucl. Ac.
Res., 12, 8711-8721 ; |
| - plasmide pBI121 : | JEFFERSON R.A. et al., 1987,
35 E.M.B.O.J., 6, 3901 ; |

- souche E. coli MC1061 : MEISSNER P.S. et al., 1987,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84
4171 ;
- souche E. coli HB101 : MANIATIS et al., Op. Cit. ;
- 05 - souche Agrobacterium tumefaciens LBA4404 :
HOEKEMA et al., 1983,
NATURE, 303, 179-180 ;
- plante Nicotiana tabacum var. Wisconsin Havana 38 :
10 SCHNEIDER M., 1990, Plant Molec.
Biol., 14, 935-947 ;
- champignon Chalara elegans : RAWLINGS R.E., 1940, Ann. Mo.
Bot. Gdn., 27, 561-598 ;
- plante Nicotiana tabacum var Paraguay 49 obtenue auprès de
l'Institut du tabac, Bergerac, France.
- 15 - champignon Alternaria brassicae : BAINS et TEWARI, 1987, Physiöl.
Mol. Plant. Pathol. 30 : 259 ;
- plante Helianthus Annuus, variété Euroflor de Rustica Semences ;
- Sinapis alba : BAINS et TEWARI, référence ci-dessus.

20 Les abréviations suivantes sont utilisées dans les
exemples ci-après :

- 32-dCTP : déoxycytidine 5'-[³²P]-triphosphate commercialisé par
AMERSHAM sous la référence 10205 ;
- 0,2 x SSC : NaCl 30 mM, citrate trisodique 3 mM ; pH 7,0 (décrit
25 par MANIATIS et al., op. cit.) ;
- SDS : dodécylsulfate de sodium ;
- FPLC : fast protein liquid chromatography ;
- PVDF : difluorure de polyvinylidène.

30 La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des
figures 1 à 6.

La figure 1 représente une carte de restriction du
fragment d'ADN génomique de l'endochitinase de tomate d'environ
3,5 kb, inséré dans le plasmide p CH3,5.

35

La figure 2 représente la séquence d'ADN génomique, et la séquence peptidique déduite, de l'endochitinase de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide p CH3,5.

05 La figure 3 représente l'alignement d'après l'homologie maximale de l'ADN génomique de l'endochitinase de tomate dépourvue des introns, (ligne inférieure), et de l'ADN complémentaire de l'endochitinase de tabac (ligne supérieure).

10 La figure 4 représente la séquence codante du gène chimérique, encadrée par les sites Bam HI et Sac I, et la séquence d'acides aminés déduites.

La figure 5 représente la séquence du gène chimérique complet.

15 La figure 6 représente la séquence de l'endochitinase recombinante mature.

EXEMPLE 1 : Construction du vecteur binaire pBR1 contenant un gène recombinant tomate-tabac de l'endochitinase

1) Préparation de la séquence codante du gène recombinant

20 a) Préparation de la partie 5' de la séquence codante du gène recombinant à partir de l'ADNg (ADN génomique) de l'endochitinase de tomate :

25 Un clone contenant l'ADNg de l'endochitinase de tomate a été obtenu de la façon suivante (Cf. Thèse de Doctorat ès Sciences spécialité : biologie moléculaire végétale, 1986, de M. DURANT-TARDIF - Université de Paris Sud) :

30 Une banque d'ADN génomique de tomate a été construite dans le phage Lambda Charon 4A par clonage de fragments issus de la digestion partielle par l'endonucléase EcoRI de l'ADN génomique de tomate Lycopersicon esculentum. La banque génomique ayant été amplifiée, $6,6 \times 10^5$ clones ont été criblés après transfert de l'ADN phagique sur nitrocellulose par les techniques bien connues de l'homme de l'art (Maniatis et al., Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984), à l'aide

d'une sonde d'ADNc codant pour une endochitinase de haricot (Broglie et al., 1986, PNAS, 83, 6820-6824).

Le clone, appelé clone 10.2 s'hybridant avec cette sonde, contient un fragment d'ADN génomique de tomate de 3,5 kb contenant une partie du gène de l'endochitinase de tomate. Ce fragment a ensuite été inséré dans le plasmide pEMBL8 (Dente et al. (1983) Nucl. Ac. Res., 11, 1645-1655) entre les sites EcoRI et HindIII. Le plasmide obtenu appelé pCH3.5 a été cloné dans E. coli. Ce plasmide a ensuite été extrait et purifié par la méthode de la lyse alcaline (BIRNBOIM et DOLY dans Maniatis et al., op. cit.).

L'utilisation de plusieurs endonucléases de restriction a permis d'établir la carte de restriction du fragment d'ADN génomique d'environ 3,5 kb inséré dans le plasmide pCH3.5, représentée sur la figure 1.

Les différents fragments EcoRI-HincII, HincII-PvuII, PvuII-EcoRV, EcoRV-HindIII ont été préparés par digestion par les endonucléases correspondantes, purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et isolés par électroélution (Maniatis et al., op. cit.). Chacun de ces fragments a été cloné dans l'ADN de la forme répliquative du phage simple brin M13mp19 (Pharmacia) entre les sites de restriction compatibles. Ces fragments ont ensuite été séquencés selon la méthode des didéoxyribonucléotides (Sanger et al., PNAS-USA, 14, 5463-5467, 1977).

La séquence (SEQ ID NO : 5), telle que déduite des expériences ci-dessus, est représentée sur la figure 2, laquelle indique également les sites de restriction utilisés pour le clonage dans pEMBL8 et les sites de restriction importants pour la suite de la construction. La séquence d'acides aminés traduite est aussi représentée sur cette figure sur la ligne inférieure par rapport à la séquence codante, les introns étant hachurés (//////).

Cette séquence possède une partie promotrice de 1940 nucléotides suivie d'une partie codante, codant pour 302 acides aminés, dans laquelle sont insérés deux introns. Cette partie codante est incomplète dans sa région 3' (pas de codon stop).

Par utilisation des sites de restriction StyI (position 2006) et HindIII (position 3007), un fragment de 1001 pb a été obtenu ; il a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion. La synthèse chimique d'un oligonucléotide de 71 pb, appelé fragment 1, dont la séquence est donnée ci-dessous, a permis de reconstituer la partie 5' éliminée en amont du site StyI et d'insérer en amont du codon ATG d'initiation de la traduction un site de restriction BamHI. Le fragment BamHI-HindIII de 1071 pb a été sous-cloné dans le vecteur pUC 19 (Pharmacia) dans les sites correspondants à l'aide de la T4 DNA ligase. Le plasmide obtenu est appelé pCH1.

Séquence du fragment 1 (SEQ ID NO : 6) :

BamHI
↓
GGATCCATGAGGCGAACTTCTAAATTGACTACTTTTTCTTTGCTGTTTTCTCTGGTTTTGCTGAGT-
GCTGC

b) Préparation de la partie 3' manquante de la séquence codante du gène chimérique :

Une comparaison de séquences à l'aide d'un logiciel approprié (logiciel UWGCG de l'université de Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721 - Option GAP : alignement optimal des séquences d'après la méthode de Needleman et Wunsch, 1970 J. mol. Biol., 48, 443-453) entre la partie codante, incomplète dans sa région 3' du clone pCH3.5 et la séquence publiée de l'ADNc de l'endochitinase de tabac comprenant 329 acides aminés (Hideaki Shinshi et al. (1987), Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 84, 89-93 et (1990) Plant Mol. Biol., 14, 357-368) montre une homologie importante entre les séquences, en particulier dans la partie 3' de celles-ci (Cf. figure 3 qui représente un alignement effectué par ce logiciel, d'après l'homologie maximale de ces deux séquences, celle de l'ADNg de l'endochitinase de tomate dépourvue de ses introns étant située sur la ligne inférieure).

On a assemblé des oligonucléotides synthétisés sur un synthétiseur d'ADN Applied Biosystems 4600, de façon à obtenir un

fragment, appelé fragment 2, dont la séquence reprend pour 71 nucléotides la séquence de l'ADNg de l'endochitinase de tomate, située en aval du site DraII (2) et pour 92 nucléotides, une séquence proche de la partie 3' de la séquence publiée de l'ADNc d'endochitinase de tabac, à laquelle on a rajouté un second codon stop et la séquence du site de restriction SacI. Cette séquence est représentée ci-après : la séquence proche de la partie 3' de la séquence de l'ADNc d'endochitinase de tabac étant soulignée et le site SacI étant indiqué (SEQ ID NO : 7) :

```

GGCCTGGAA TGTGGTCGTG GCAATGACAA TAGGGTCCAG GATCGCATTG GGTTTTACAG
GAGGTATTGC GGTATTCTTG GTGTTAGTCC TGGTGACAAT CTTGATTGCG GAAACCAGAG
ATCTTTTGGG AACGGACTTT TAGTCGATAC TATGTAATGA GCTC
                                ↑
                                SacI

```

On a soumis à une hydrolyse partielle par les enzymes de restriction BamHI et DraII le plasmide pCH1, puis isolé et purifié après électrophorèse sur gel d'agarose un fragment de 999 pb, appelé fragment 3, dont les extrémités sont constituées par le site BamHI en 5' et par le site DraII (2) en 3' (Cf. figure 2), les fragments 2 et 3 ont été ligués à l'aide de la T4 DNA ligase dans le plasmide pUC 19, ouvert aux sites de restriction BamHI et SacI. Le plasmide obtenu est appelé pCH1.2. On a vérifié par séquençage que la partie BamHI - SacI de ce plasmide comportait la séquence attendue. Celle-ci, ainsi que la séquence d'acides aminés déduite, est représentée sur la figure 4. Cette séquence comprend la séquence codante du gène chimérique encadrée par les sites de restriction BamHI et SacI. Celle-ci code pour une protéine de 329 acides aminés comprenant un peptide signal supposé de 24 acides aminés (déterminé à l'aide d'un logiciel qui utilise la méthode décrite par G. von Heijne, 1986, Nucl. Ac. Res., 14, 483-490). La masse moléculaire attendue d'après la séquence de cette protéine clivée de son peptide signal supposé est d'environ 32 kDa.

2) Préparation du gène chimérique complet et clonage de celui-ci dans le vecteur binaire pBIN 19.

05 La séquence codante obtenue précédemment a été insérée entre une séquence promotrice comprenant le promoteur dit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV) et une séquence terminatrice comprenant le terminateur de la nopaline synthase (NOS) d'Agrobacterium tumefaciens.

10 a) Préparation de la séquence promotrice comprenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur :

A partir du plasmide pBI121 (Clontech) par coupure à l'aide des endonucléases HindIII et BamHI, puis électrophorèse, le fragment HindIII-BamHI d'environ 900 pb contenant le promoteur 35S est isolé. Ce fragment est recoupé par HindII. Le fragment
15 d'environ 410 pb, portant le site BamHI, est traité par la T4 DNA ligase en présence d'un linker HindIII (séquence synthétique contenant un site HindIII). Après coupure par l'endonucléase HindIII et électrophorèse, le fragment HindIII-BamHI résultant (d'environ 420 pb) est isolé et purifié.

20

b) Préparation de la séquence terminatrice comprenant le terminateur de la nopaline synthase (NOS) d'Agrobacterium tumefaciens.

25 A partir du plasmide pBI121 (Clontech) par coupure à l'aide des enzymes de restriction SacI et EcoRI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, un fragment de 250 pb environ, renfermant le terminateur de la nopaline synthase, a été isolé.

On a ligué à l'aide de la T4 DNA ligase la séquence promotrice, la séquence codante du gène chimérique de la chitinase et
30 la séquence terminatrice dans le vecteur binaire pBIN19 ouvert à l'aide des endonucléases HindIII et EcoRI. La partie de ce vecteur qui pourra être transféré aux végétaux comprend un gène de résistance à la kanamycine immédiatement en amont du gène chimérique complet (Cf. BEVAN (1984), Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721). Le gène
35 de résistance à la kanamycine servira de marqueur de sélection au

cours des étapes de transformation et d'analyse de la descendance des plantes transformées.

Le vecteur obtenu est appelé pBR1. La séquence du gène chimérique complet (SEQ ID NO : 8), vérifiée par séquençage, est représentée sur la figure 5. Le plasmide est cloné dans la souche E. coli MC1061 (Clontech).

EXEMPLE 2 : Transfert dans Agrobacterium tumefaciens ou Agrobacterium rhizogenes du plasmide pBR1 contenant le gène chimérique tomate-tabac de l'endochitinase.

a) Transfert dans Agrobacterium tumefaciens

Ce transfert est réalisé comme décrit ci-après par conjugaison triparentale entre la souche E. coli MC1061 contenant le vecteur pBR1 et la souche Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clontech) à l'aide de la souche E. coli HB101 contenant le plasmide mobilisateur pRK2013.

La souche E. coli MC1061 contenant le plasmide pBR1 et une souche E. coli HB101 (Clontech) contenant le plasmide mobilisateur pRK2013 sont cultivées à 37°C dans du milieu Luria (Gibco) en présence de 25 mg/l de kanamycine.

La souche Agrobacterium tumefaciens LBA4404 est cultivée à 28°C dans du milieu Luria en présence de 100 mg/l de rifampicine (elle est résistante à cet antibiotique) ; 200 µl de chacune des trois cultures sont mélangés, étalés sur du milieu Luria gélosé (Gibco) et incubés toute la nuit à 28°C. Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans 5 ml de milieu Luria et des parties aliquotes sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum gélosé (décrit dans "Plant molecular biology manual" GELVIN et al., Kluwer Academic Press, 1988) en présence de 100 mg/l de rifampicine, 25 mg/l de kanamycine. Dans ces conditions, seules poussent les colonies d'Agrobacterium tumefaciens ayant intégré le plasmide pBR1. Celles-ci contiennent le gène chimérique dans un contexte permettant sa réplication.

La résistance aux deux antibiotiques des colonies sélectionnées est vérifiée en repiquant celles-ci sur le même milieu de

sélection deux fois de suite. La présence du gène chimérique de l'endochitinase dans Agrobacterium tumefaciens est vérifiée par la méthode de Southern sur une préparation d'ADN total. (Lyse des cellules, purification de l'ADN par extraction à l'aide du mélange phénol/chloroforme, selon le protocole décrit par GELVIN dans l'ouvrage cité ci-dessus, coupure de l'ADN purifié à l'aide d'enzymes de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, transfert sur membrane et hybridation selon les techniques bien connues de l'homme de l'art).

10

b) Transfert dans Agrobacterium rhizogenes

Ce transfert est réalisé de la même façon que le transfert dans Agrobacterium tumefaciens décrit en a), avec la souche Agrobacterium rhizogenes A4 décrite par GUERCHE et al. (1987) Mol. gen. genet. 206, 382.

15

EXEMPLE 3 : Obtention de plantes de tabac transformées.

Le tabac Nicotiana tabacum cultivé in vitro a été infecté par Agrobacterium tumefaciens contenant le plasmide pBR1 selon la procédure de Horsch et al., bien connue de l'homme du métier (HORSH R.B et al. 1985, Science 227, 1229-1231), dont les principales étapes sont exposées ci-après.

20

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac N. tabacum (variété Wisconsin Havana 38 sensible aux champignons pathogènes) sont incubés dans une culture d'A. tumefaciens hébergeant le plasmide pBR1. Les disques égouttés sur papier Whatman ont été transférés sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals, puis produire des pousses en présence de céfotaxime (500 µg/ml) et de kanamycine (100 µg/ml). Les pousses résistantes à la kanamycine ont été ensuite transférées sur un milieu permettant l'induction des racines en présence de céfotaxime et de kanamycine. Les plantules sont ensuite repiquées en terrines dans un substrat composé de tourbe et de terreau et mises à croître en serre. Toutes les plantes transformées (génération Ro) ayant survécu aux étapes de régénération et d'acclimatation en serre se sont révélées

25

30

35

morphologiquement normales et fertiles. Elles ont été autofécondées et ont donné des graines (génération R_1).

05 EXEMPLE 4 : Analyse de l'ADN génomique des plantes de tabac transformées (génération R_0) selon la technique de SOUTHERN Blot.

10 L'ADN génomique de haut poids moléculaire a été isolé à partir de feuilles matures de plantes transgéniques de la génération R_0 selon la méthode d'extraction à l'aide de bromure de cetyltriméthylammonium et de purification par précipitation, décrite dans l'ouvrage "Plant Molecular Biology Manual" déjà cité.

15 10 μ g de cet ADN génomique ont été digérés toute la nuit à 37°C avec 20 unités des enzymes de restriction HindIII et EcoRI. Les fragments de restriction obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %). L'ADN a été transféré selon la méthode de SOUTHERN Blot sur un filtre de nitrocellulose et hybridé avec une sonde nucléotidique comprenant la séquence du gène chimérique recombinant marquée à l' α^{32} -dCTP par marquage au hasard (random priming). Le lavage à haute stringence a été réalisé en
20 présence de 0,2 x SSC, 0,1 % SDS à 68°C avant l'autoradiographie. L'analyse de l'autoradiogramme permet de tirer les conclusions suivantes :

- certaines plantes ne possèdent pas de copies du gène transféré (absence de signal).
- 25 - La plupart des plantes testées contiennent au moins une copie sans réarrangement de la construction : promoteur 35S CaMV - gène chimérique de l'endochitinase - terminateur NOS.
- Certains profils suggèrent qu'il existe des réarrangements internes dans la construction, mais ces événements sont
30 rares.

EXEMPLE 5 : Détermination pour les plantes de tabac transformées (générations Ro, R₁ et R₂) de l'expression de l'endochitinase recombinante.

05 1) Analyse de l'ARN messenger selon la technique de Northern Blot.

 L'ARN total des plantes transformées de la génération Ro a été isolé selon le protocole de VERWOERD et al., NAR, 17, 2362, 1989. Des portions de feuilles sont prélevées et broyées, puis
10 traitées par un mélange de phénol/Tris-HCl pH 8,0/LiCl 0,1M.

 Les ARN sont purifiés par traitement au chloroforme, puis au LiCl 2M et précipités.

 15 µg d'ARN de chaque plante sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) en conditions dénaturantes
15 (Maniatis op. cit.) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C-extra Amersham). Les ARN messagers (ARNm) correspondant au gène introduit sont repérés à l'aide d'une sonde oligonuléotidique de séquence (SEQ ID NO : 9) :

20 5' AGGGCCGCCACCTGGACACTGA 3'

 préalablement marquée au moyen d' α^{32} -dCTP et de la terminal transférase (Boehringer Mannheim) selon le protocole décrit dans Maniatis et al. (op. cit.).

25 Cette analyse a permis de mettre en évidence pour les plantes transformées la présence d'un signal d'hybridation correspondant à un ARN messenger d'environ 1500 nucléotides, absent des plantes non transformées.

30 2) Détermination de l'expression de l'endochitinase.

 La méthode utilisée fait appel à la visualisation par des techniques immunologiques de l'endochitinase recombinante.

 a) Préparation des anticorps : une endochitinase de
35 tomate a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir de cals de tomate comme décrit ci-après : des cals de tomate ont été cultivés

in vitro sur un milieu de Murashige et Skoog (Murashige T. et Skoog F., 1962, Physiol. Plant., 15, 473-497) contenant 0,1 mg/l d'ANA (acide naphthalène acétique) et 1 mg/l de BAP (benzylamino purine).

05 Des extraits cellulaires sont obtenus par broyage du matériel végétal dans une solution tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,4 contenant 15 mM de β mercaptoéthanol et 5 % de polyvinylpyrrolidone.

10 La protéine est purifiée à partir de cet extrait par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie en phase liquide selon la technique FPLC de PHARMACIA sur la colonne échangeuse de cations à base de polymère synthétique (Mono S de Pharmacia), et chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire) sur un agarose réticulé selon le protocole décrit ci-après :

15 Protocole de purification de l'endochitinase de tomate :

ETAPE 1 : L'extrait protéique est précipité par le sulfate d'ammonium (60 % de saturation). Les protéines ayant précipité sont récupérées par centrifugation (15 000 g pendant 30 min), solubilisées dans une solution tampon (acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2) et dialysées une nuit à 4°C contre une solution tampon acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2.

25 Extemporément, la concentration de la solution tampon de l'extrait protéique est ramenée à 10 mM par passage sur des mini-colonnes prêtes à l'emploi (PD10. Pharmacia).

30 ETAPE 2 : L'extrait protéique est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions à base de polymère synthétique (colonne Mono-S de Pharmacia) à l'aide d'une technique FPLC (Pharmacia).

L'extrait est déposé sur la colonne Mono-S équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient linéaire de 10 à 500 mM d'acétate d'ammonium.

35

05 ETAPE 3 : Les fractions contenant l'endochitinase de tomate sont concentrées par ultrafiltration sur membrane Centricon 10 (Amicon). La purification de la protéine est poursuivie par chromatographie (tamisage moléculaire) sur un agarose réticulé (colonne SUPEROSE 12 Pharmacia), l'élution est réalisée par une solution tampon acétate d'ammonium 500 mM pH 5,2.

10 A chaque étape, l'endochitinase de tomate est identifiée par son poids moléculaire (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS - révélation à l'argent) et son activité endochitinase, mesurée par une méthode radiochimique (Cf. exemple 9 ci-après) utilisant la chitine marquée comme substrat (MOLANO et al. (1977) Anal. Biochem 83, 648-656).

15 On a ensuite injecté à des lapins 25 µg d'endochitinase de tomate dans 500 µl d'adjuvant complet de Freund. Trois injections de rappel de 25 µg dans l'adjuvant incomplet de Freund (500 µl) ont été réalisées à 3 semaines d'intervalle. L'immunsérum a été prélevé après la dernière injection.

20 b) Préparation des extraits bruts de protéines de plantes de tabac transformées (génération Ro) :

25 Les extraits bruts de protéines ont été préparés à partir de différents tissus de la plante (racine, tige, feuille, etc...). Les fragments de tissus ont été congelés dans l'azote liquide, réduits en poudre et stockés à -20°C. La poudre a été extraite à 4°C en présence d'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M pH 5,2 et soumise à une centrifugation à 10 000 g. La concentration des protéines totales a été déterminée sur les surnageants, appelés ci-après les extraits bruts de protéines en suivant la technique de Bradford (Bradford, M.M., (1976) Anal. Biochem., 72, 248-254).

30

c) Mise en évidence par immuno-empreinte (Western Blot)

35 On soumet les extraits bruts de protéines de différentes plantes transformées et des plantes non transformées (témoins) à un Western Blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite notamment par H. TOWBIN et al. : Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 76, 1972, 4350-4354, qui comprend les étapes suivantes :

05 - dénaturation par ébullition pendant 10 min dans un tampon dénommé tampon de charge constitué de Tris HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, β -mercaptoéthanol 10 % (selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, Nature, 227 (1970), 680-685) ;

- séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisé selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, Nature, 227 (1970), 680-685) ;

10 - électrotransfert desdites protéines contenues dans le gel sur une membrane en PVDF (selon la technique de H. TOWBIN et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350-4354).

L'immunodétection est réalisée selon un protocole qui comprend les étapes suivantes :

15 - saturation de la membrane PVDF sur laquelle les protéines ont été transférées par incubation au minimum 2 heures à 37°C dans une solution de gélatine à 3 %

- 3 lavages dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % du détergent Tween 20

20 - incubation (1 heure à 37°C) en présence de l'immunsérum préparé précédemment (contenant les anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine recombinante) dilué au 1/10 000 dans du tampon phosphate salin

- 3 lavages dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % du détergent Tween 20.

25 Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'AMERSHAM (Blotting-détection kit) utilisé selon les indications du fabricant.

30 L'empreinte obtenue montre la présence d'une protéine d'environ 26 kDa pour les plantes transformées, absente des plantes témoins. (La protéine déduite de la séquence du gène chimérique, clivée de son peptide signal supposé, a une masse moléculaire d'environ 32 kDa).

35 L'analyse selon la technique de Northern Blot et selon celle de Western Blot a été effectuée sur 30 plantes transformées

(répondant positivement au Southern Blot). 28 plantes ont montré une expression de l'ARN messager du gène chimérique en Northern Blot et une expression de l'endochitinase recombinante en Western Blot. La non-expression pour 2 plantes résulte probablement de l'insertion du gène chimérique dans un contexte non transcrit.

L'analyse, selon la technique de Northern Blot et selon celle de Western Blot, a été également effectuée sur les plantes de la génération R_1 issues de plantes transformées de la génération R_0 exprimant la protéine recombinante et sur des plantes de la génération R_2 issues de plantes de la génération R_1 exprimant la protéine recombinante. En accord avec la ségrégation Mendelienne (Cf. exemple 6 ci-après), la plupart, mais non la totalité, des plantes de la génération R_1 et de la génération R_2 expriment la protéine recombinante.

Ces résultats montrent donc la stabilité de l'insertion du gène dans les plantes de tabac et de son expression au cours des générations successives.

EXEMPLE 6 : Analyse génétique des plantes de tabac transformées (génération R_1).

Les tabacs régénérés (génération R_0) en présence de kanamycine ont été autopollinisés. Les graines matures (génération R_1) sont récoltées et stockées en tubes Eppendorf à 4°C. Les graines sont stérilisées en surface à l'aide d'une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium à 2 %. Les graines sont ensuite rincées à l'eau stérile, séchées pendant 24 h dans une hotte à flux laminaire sur du papier filtre et mises à germer sur du milieu Murashige et Skoog gélosé, complété par 100 µg/ml de kanamycine (le gène de résistance à la kanamycine lié au gène chimérique complet et transféré au tabac en même temps que celui-ci sert ici de marqueur de sélection).

L'analyse génétique a été effectuée sur les descendance de 16 plantes transformées (de la génération R_0) choisies parmi les 28 plantes exprimant l'endochitinase recombinante (Cf. exemple 4), abrégées T_n (n étant le n^0 attribué à la plante) et d'une plante témoin Nicotiana tabacum var Wisconsin Havana 38 non transformée,

abrégée WH 38. Le nombre d'individus observés (effectif total) varie selon les descendance de 27 à 139. Le taux de germination est élevé (de l'ordre de 95 %) et comparable pour toutes les plantes étudiées.

05 Deux types de phénotypes sont observés au moment de la germination des graines :

- des plantules résistantes à la kanamycine qui poussent bien en présence de 100 µg/ml de kanamycine et possèdent un système racinaire développé et des feuilles vertes,

10 - des plantules sensibles à la kanamycine, correspondant soit à des plantes qui ne développent pas de racines et qui produisent des feuilles blanches, soit à des plantes pour lesquelles le système racinaire est réduit et qui produisent des feuilles avec des zones blanches.

15 On définit la ségrégation génétique comme le rapport du nombre de plantes résistantes sur le nombre de plantes sensibles à la kanamycine.

Le tableau 1 ci-après rassemble les résultats obtenus :

Tableau 1

SEGREGATIONS OBSERVEES CHEZ LES DESCENDANCES DE PLANTES DE TABAC TRANSFORMEES ET INTERPRETATION

PLANTE	Km ^r effectifs observés	Km ^s Effectifs totaux	Segregation théorique testée	Km ^r effectifs théoriques	khi-2	Conclusion : ségrégation effective
Plantes transformées						
T1	62	27	3 : 1	66,75	1,35	3 : 1
T2	66	14	3 : 1	60	2,40	3 : 1
T4	66	25	3 : 1	68,25	0,30	3 : 1
T6	86	5	15 : 1	85,31	0,09	15 : 1
T11	48	11	3 : 1	44,25	1,27	3 : 1
T12	61	31	3 : 1	69	3,71	3 : 1
T14	85	3	15 : 1	82,5	1,21	15 : 1
T16	73	21	3 : 1	70,5	0,35	3 : 1
T19	74	19	3 : 1	69,75	1,04	3 : 1
T27	35	13	3 : 1	36	0,11	3 : 1
T28	51	19	3 : 1	52,5	0,17	3 : 1
T29	59	26	3 : 1	63,75	1,42	3 : 1
T30	17	10	3 : 1	20,25	1,59	3 : 1
T31	139	0	-	-	-	> 2loci
T36	65	25	3 : 1	67,50	0,37	3 : 1
T37	71	25	3 : 1	72	0,06	3 : 1
Plante témoin	0	89	-	-	-	-

WH38 : plante *Nicotiana tabacum* var. Wisconsin Havana 38 non transformée

In : descendance de la plante transformée exprimant l'endochitinase recombinante

Km^r : nombre de plantes résistantes à la kanamycine. khi-2 au seuil de 5 % = 3,84

Km^s : nombre de plantes sensibles à la kanamycine

Lorsque le khi-2 observé est inférieur à 3,84, les ségrégations observées et supposées coïncident.

L'analyse statistique des résultats rassemblés dans le tableau 1 ci-dessus montre que le caractère : résistance à la kanamycine, génétiquement lié au caractère conféré par le gène chimérique de l'endochitinase se comporte comme un caractère Mendélien dominant simple (ségrégation Mendélienne 3/1 ou 15/1) présent en un seul locus (une copie ou plusieurs copies du gène proches : 3/1), en deux loci (deux ensembles distants génétiquement comprenant chacun une copie ou plusieurs copies du gène proches génétiquement : 15/1) ou en plus de deux loci (cas de la plante T31).

Le nombre de loci dans chaque plante a été confirmé par l'analyse des descendance de la génération R_2 .

EXEMPLE 7 : Mesure de la résistance aux champignons pathogènes des plantes transformées (génération R_1)

Les plantules de la génération R_1 résistantes à la kanamycine issues des 16 plantes transformées choisies, d'une plante Nicotiana tabacum var. Wisconsin Havana 38 sensible à Chalara elegans (également appelé Thielaviopsis basicola), abrégée WH38, et d'une plante Nicotiana tabacum var. Paraguay 49, abrégée P49, génétiquement tolérante à ce champignon, ont été transférées en serre pour évaluation de leur résistance à ce champignon. Ce dernier a été choisi car il est représentatif des champignons pathogènes du tabac possédant de la chitine dans leur paroi. L'étude a porté sur des effectifs de plantules variant de 15 à 36 selon les plantes. Le protocole choisi dans cette étude est décrit ci-après :

Les plantules sont cultivées en godets (3 x 3 cm). A l'apparition de la 5ème feuille, les plantes sont inoculées en déposant au niveau du collet une suspension d'endoconidies 5×10^5 spores/ml). Les endoconidies sont prélevées sur des cultures mycéliennes de ce champignon entretenues sur le milieu "potato dextrose agar" (Difco) à 22°C et à l'obscurité. On évalue la résistance à Chalara elegans en attribuant une note 45 jours après l'inoculation. Les plantes sont notées selon les symptômes d'infection et selon leur niveau de développement végétatif par rapport à un témoin non inoculé (ce témoin est une plante WH38 non inoculée pour les plantes issues des 16 plantes transformées choisies et de

la plante WH38 et une plante P49 non inoculée pour les plantes issues de la plante P49). Les classes sont définies selon les critères suivants :

- 05 Note 0 : plante morte ; note 1 : bourgeon terminal encore vert, système racinaire détruit ; note 2 : développement des plantes ne dépassant pas 25 % de celui du témoin, système racinaire entièrement nécrosé ; note 3 : développement de plantes atteignant 50 % du développement du témoin, système racinaire présentant des parties saines ; note 4 : développement des plantes identiques au
- 10 témoin.

L'indice de résistance de la descendance d'une plante transformée représente la moyenne des notes effectuées sur les plantules issues de cette plante.

Le tableau 2 ci-après rassemble les résultats obtenus :

Tableau 2

MESURE DE LA RESISTANCE AUX CHAMPIGNONS PATHOGENES DE DESCENDANCES
DE PLANTES DE TABAC TRANSFORMEES

05			
	Plante	Effectif testé	Indice de résistance de la descendance
10	Plantes transformées		
	T1	32	2,030
	T2	31	0,065
	T4	36	1,200
	T6	34	0,743
15	T11	35	2,514
	T12	33	1,632
	T14	26	1,769
	T16	36	1,750
	T19	36	1,416
20	T27	20	0,050
	T28	27	1,444
	T29	36	1,750
	T30	15	2,666
	T31	36	2,888
25	T36	36	1,686
	Plantes WH38	34	0,044
	témoins P49	34	2,823

WH38 : plante Nicotiana tabacum var. Wisconsin Havana 38 non transformée

P39 : plante Nicotiana tabacum var Paraguay 49

Tn : descendance de la plante transformée exprimant l'endochitinase recombinante.

On constate à la lecture du tableau ci-dessus que toutes les descendance des plantes transformées In présentent un indice de résistance supérieur à celui de la descendance de la plante témoin WH38 (plante non transformée) et parfois proche de, voire supérieur à, celui de la descendance de la plante témoin P49 génétiquement résistante.

EXEMPLE 8 : Obtention de plantes de colza transformées

La transformation est réalisée selon le protocole de P. GUERCHE et al. (P. GUERCHE et al. 1987, Mol. Gen. Genet., 206, 382). Les différents milieux de culture sont ceux décrits par Pelletier et al. (Pelletier et al., 1983, Mol. gen. genet., 191, 244). Leur composition sera explicitée par la suite (tableau 3).

a) Obtention de racines transformées

Des segments de tige sont prélevés sur l'extrémité apicale de plantes de colza (Brassica napus : variétés de printemps Brutor et Westar et variété d'hiver) de 1 m de haut environ. Ces segments sont stérilisés en surface, rincés dans de l'eau stérile, découpés en segments de 1,5 cm de long environ et placés dans un tube contenant le milieu A.

L'inoculation de l'extrémité de ce segment est effectuée par dépôt d'une suspension de la souche d'Agrobacterium rhizogenes contenant le plasmide pBR1.

Des racines transformées apparaissent sur le segment de tige au bout de 1 à 2 semaines, elles sont prélevées et placées sur le milieu B gélosé (15 g/l) et complémentées par 500 µg de céfotaxime/ml.

b) Obtention des cals transformés

Des fragments de racines sont incubés pendant 15 jours sur le milieu D contenant 3 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, puis transférés sur le même milieu gélosé (15 g/l) en vue de la multiplication des cellules transformées de façon à obtenir des

cals et à fournir des extraits bruts destinés à la purification de la protéine recombinante (Cf. exemple 10 ci-après).

c) Régénération de plantes transformées

05

Des fragments de racines sont incubés pendant 15 jours sur le milieu D contenant 3 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, puis placés sur le milieu RCC d'induction de bourgeons. Des plantes racinées sont ensuite obtenues par passage des bourgeons

10

sur les milieux F et G.

Tableau 3

Composition des différents milieux utilisés pour l'obtention de plantes de colza transformées

Milieu Composition (mg/l)	A	B	D	RCC	F	G
NH_4NO_3	1 650		200	1 650	1 650	825
KNO_3	1 900	2 500	1 250	1 900	1 900	950
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		134	67			
NaH_2PO_4		150	75			
KH_2PO_4	170		35	170	170	85
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	750	525	440	440	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	250	370	370	185
H_3BO_3	12,4	3	12,4	12,4	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	33,6	10	33,6	33,6	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21	2	21	21	8,6	8,6
KI	1,66	0,75	1,66	1,66	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,025	0,05	0,05	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,025	0,05	0,05	0,025	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,24	27,8	27,8	27,8	27,8	22,24

Tableau 3 (suite 1)

Milieu Composition (mg/L)	A	B	D	RCC	F	G
Na ₂ EDTA	29,84	37,3	37,3	37,3	37,3	29,84
Inositol	100	100	100	100	100	100
Acide nicotinique	0,5	1	1	0,5	1	0,5
Pyridoxine HCL	0,5	1	1	0,5	1	0,5
Thiamine		10	10		10	
Glycine	2			2		2
Glucose	10 000	20 000				
Saccharose	10 000		20 000		10 000	10 000
D-mannitol		70 000		10 000		
N.A.A.		1		1		
B.A.		1		0,5	0,1	0,01
2,4D		0,25			0,5	
Adénine sulfate			1			
I.P.A.			30			
GA				0,5		
Tween 80		10		0,02		

Tableau 3 (suite 2)

Milieu Composition (mg/l)	A		B		D		RCC		F		G	
Agar	8 000		5,8		5,8		8 000		8 000		8 000	
pH	5,8		5,8		5,8		5,8		5,8		5,8	
Gentamicine (sulfate)	10											

NAA = acide naphthalène acétique

BA = acide benzyl-6-aminopurine

2,4D = acide dichloro-2,4-phénoxyacétique

IPA = N⁶-(Δ^2 Iso-pentényl) adénineGA₃ = acide gibbéréllique

EDTA = acide éthylènediaminetétracétique.

EXEMPLE 9 : Analyse de l'ADN génomique des plantes de colza transformées (génération Ro) et détermination pour ces dernières et de leurs descendances de l'expression de l'endochitinase recombinante.

05

1) Analyse de l'ADN génomique selon la technique de Southern Blot

L'analyse de l'ADN génomique selon la technique de Southern Blot, effectuée dans les conditions décrites dans l'exemple 4, a permis de constater que la plupart des plantes testées contiennent au moins une copie sans réarrangement de la construction promoteur 35S CaMV - gène chimérique de l'endochitinase - terminateur NOS.

10

2) Analyse de l'ARN messenger selon la technique de Northern Blot

L'analyse de l'ARN messenger selon la technique de Northern Blot, effectuée dans les conditions décrites dans l'exemple 5, n'a été mise en oeuvre que pour quelques plantes, l'analyse selon la technique de Western Blot étant plus rapide pour fournir l'information attendue. Elle a permis de mettre en évidence pour les plantes transformées analysées la présence d'un ARN messenger d'environ 1 500 nucléotides, absent des plantes non transformées.

15

20

3) Détermination de l'expression de l'endochitinase recombinante par Western Blot

25

L'analyse en Western Blot, effectuée dans les conditions et à l'aide des anticorps décrits dans l'exemple 5 sur les extraits bruts de protéines de plantes de colza transformées (préparés comme décrit dans l'exemple 5 pour les extraits bruts de protéines de plantes de tabac transformées) a permis de visualiser la protéine recombinante.

30

L'empreinte obtenue montre la présence d'une protéine d'environ 26 kDa pour les plantes transformées, absente des plantes témoins (la protéine déduite de la séquence du gène chimérique, clivée de son peptide signal a une masse moléculaire d'environ 32 kDa) et également la présence d'une protéine d'environ 38 kDa

35

reconnue par les anticorps, présente également dans les plantes non transformées. Cette dernière est une endochitinase endogène (Atta K.K. et al., 1988, Abstracts du Second International Congress of Plant Molecular Biology, Jerusalem) qui présente des caractéristiques sérologiques communes avec celles de l'endochitinase recombinante.

L'analyse selon la technique de Western Blot a été effectuée sur 42 plantes transformées (répondant positivement au Southern Blot). 38 plantes ont montré une expression de l'endochitinase recombinante. La non-expression observée pour 4 plantes résulte probablement de l'insertion du gène chimérique dans un contexte non transcrit.

L'analyse selon la technique de Western Blot a également été effectuée sur des plantes de la génération R_1 issues de plantes transformées de la génération R_0 exprimant l'endochitinase recombinante. En accord avec les lois de la génétique pour l'hérédité des diploïdes, la plupart mais non la totalité de celles-ci expriment la protéine recombinante.

Ces résultats montrent la stabilité de l'insertion du gène dans les plantes de colza et de son expression au cours des générations.

EXEMPLE 10 : Purification de l'endochitinase recombinante des cals de colza transformés (génération R_0), mesure de son activité enzymatique et détermination de sa séquence aminoterminal.

1) Purification de l'endochitinase recombinante :

La protéine recombinante a été purifiée à partir des extraits bruts de protéines de cals de colza transformés, par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie en phase liquide FPLC sur une colonne échangeuse de cations à base de polymère synthétique et chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire) sur un agarose réticulé, selon le protocole décrit ci-après :

Protocole de purification de l'endochitinase recombinante

05 ETAPE 1 : L'extrait protéique est précipité par le sulfate d'ammonium (60 % de saturation). Les protéines ayant précipité sont récupérées par centrifugation (15 000 g pendant 30 min), solubilisées dans une solution tampon (acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2) et dialysées une nuit à 4°C contre une solution tampon acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2.

10 Extemporaneamente, la concentration de la solution tampon de l'extrait protéique est ramenée à 10 mM par passage sur des mini-colonnes prêtes à l'emploi (PD10. Pharmacia).

15 ETAPE 2 : L'extrait protéique est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions à base de polymère synthétique (colonne Mono-S de Pharmacia) à l'aide d'une technique FPLC (Pharmacia).

20 L'extrait est déposé sur la colonne Mono-S équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient linéaire de 10 à 500 mM d'acétate d'ammonium.

25 ETAPE 3 : Les fractions contenant l'endochitinase recombinante sont concentrées par ultrafiltration sur membrane Centricon 10 (Amicon). La purification de la protéine est poursuivie par chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire) sur un agarose réticulé (colonne SUPEROSE 12 PHARMACIA), l'élution étant réalisée par une solution tampon acétate d'ammonium 500 mM pH 5,2.

30 A chaque étape, l'endochitinase de tomate est identifiée par son poids moléculaire (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS-révélation à l'argent), par son immuno-empreinte (Cf. exemple 5 c)) et son activité endochitinase, mesurée par une méthode radiochimique décrite ci-après utilisant la chitine marquée comme substrat (MOLANO et al. (1977) Anal. Biochem 83, 648-656).

2) Mesure de l'activité enzymatique de l'endochitinase recombinante.

a) Méthode

L'activité endochitinase est mesurée par une méthode radiochimique utilisant la chitine marquée au tritium comme substrat selon un protocole décrit par MOLANO et al., 1977, Anal. Biochem 83, 648-656, résumé ci-après.

A 50 µl de chitine tritiée (50 kBq/ml), lavés préalablement par 4 centrifugations successives et renouvellement du solvant, on ajoute 50 µl de fraction contenant l'endochitinase recombinante puis 250 µl de solution tampon acétate de sodium 0,2 M pH 4,5. Après 45 min d'incubation à 20°C, la réaction est arrêtée par addition de 100 µl d'acide trichloroacétique 20 %. Après centrifugation (10 000 g pendant 10 min), la quantité de radioactivité solubilisée dans 100 µl de surnageant est mesurée en scintillation liquide.

A chaque étape de purification selon la méthode décrite ci-dessus, la protéine recombinante (identifiée grâce à son poids moléculaire et sa réaction positive avec les anticorps polyclonaux contre l'endochitinase de tomate) montre une activité endochitinase.

b) Résultats

Les activités spécifiques mesurées à l'issue de l'étape 1, de l'étape 2 et de l'étape 3 sont respectivement de 135, 7 416 et 32 193 cpm/µg de protéine.

3) Détermination de la séquence aminoterminal de l'endochitinase recombinante mature.

Après purification de l'endochitinase recombinante selon le protocole décrit ci-dessus, le séquençage de l'extrémité aminoterminal a été réalisé. Les échantillons à traiter sont portés à la surface d'un filtre PVDF (polyvinylidenedifluoride) par électrotransfert selon la méthode décrite par H. TOWBIN et al. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA (1979), 4350-4354, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le filtre est introduit dans un

séquenceur de protéines (modèle 470 A commercialisé par la Société Applied Biosystems (E.U.A.)) équipé d'un chromatographe (modèle 430 d'Applied Biosystems) qui analyse en continu les dérivés phénylthiohydantoïques formés, après chaque cycle de dégradation.

05 La séquence aminoterminal déterminée (SEQ ID NO : 10) est représentée ci-après, le symbole Xaa représentant un acide aminé non déterminé :

10 Gly-Gly-Xaa-Leu-Gly-Ser-Val-Ile-Ser-Asn-Xaa-Met-Phe-Xaa-Gln-Met-Leu-Lys-Xaa-Arg

15 On constate que le début de la séquence de la protéine mature, SEQ ID NO : 1 représentée sur la figure 6, correspond au 76ème acide aminé à partir de la méthionine aminoterminal déduite de la séquence du gène chimérique (SEQ ID NO : 11), telle que représentée sur la figure 4.

20 La protéine traduite à partir de l'ARN messenger codé par le gène chimérique subit un clivage de son peptide signal, supposé de 24 acides aminés (G. von Heijne, 1986, Nucl. Ac. Res., 14, 483-490), puis une maturation provoquant le clivage d'un peptide aminoterminal de 51 acides aminés.

25 La séquence du gène chimérique contient donc les informations nécessaires à la synthèse d'une protéine de type preproenzyme, qui est maturée en endochitinase active.

EXEMPLE 11 : Analyse génétique des plantes de colza transformées (génération R_1)

30 Les colzas régénérés (génération R_0) ont été autopollinisés. Les graines matures (génération R_1) sont récoltées et stockées dans des sachets. Ces graines sont ensuite semées dans des bacs sur de la vermiculite, puis les jeunes plantes sont repiquées individuellement en pot de 2 l contenant du terreau horticole. L'expression de la protéine recombinante est mise en évidence par
35 la technique de Western blot sur des jeunes feuilles (cf. para-

graphe 3 de l'exemple 9, après extraction des protéines selon le protocole décrit dans l'exemple 5b).

05 En accord avec les lois de la génétique pour l'hérédité des diploïdes, la plupart, mais non la totalité de ces plantes expriment la protéine recombinante.

15 des descendance de colzas transformés ont été analysées statistiquement selon le protocole décrit dans l'exemple 7. Les résultats obtenus montrent que le caractère expression du gène chimérique de l'endochitinase se comporte comme un caractère
10 Mendélien dominant simple présent en un seul locus (12 descendance sur 15 présentent la ségrégation Mendélienne 3/1) ou en deux loci (3 descendance sur 15 présentent la ségrégation Mendélienne 15/1).

15 EXEMPLE 12 : Mesure de la résistance aux champignons pathogènes des plantes de colza transformées (génération R_2)

Les plantes de génération R_1 , exprimant la protéine recombinante sont autopollinisées. Les graines obtenues de génération R_2 , sont mises à germer comme décrit dans l'exemple 11.

20 La résistance des plantes de colza exprimant la protéine recombinante est estimée sur les plantes de génération R_2 par inoculation en chambre de culture à l'aide d'Alternaria brassicae, champignon représentatif des champignons pathogènes du colza, selon le protocole décrit par Bains et Tewari, 1987, Physiol. Mol. Plant. Pathol. 30:259 et résumé ci-après.

25 Des jeunes plantes de colza âgées de 21 jours sont inoculées à l'aide d'une suspension de spores déposée sur la nervure centrale de la première feuille, préalablement blessée à l'aide d'une aiguille. Deux semaines plus tard, l'extension de la nécrose
30 résultant du développement du champignon parasite est mesurée.

Les résultats obtenus à partir des descendance de 10 plantes transformées, montrent que trois descendance présentent une résistance notablement accrue, proche de celle d'une variété de moutarde Sinapis alba, (bains et tewari, référence ci-dessus),
35 génétiquement résistante à Alternaria brassicae.

EXEMPLE 13 : Obtention des racines de tournesol transformées.

Des segments de pétioles sont prélevés sur des plantes de tournesol Helianthus annuus (variété Euroflor Rustica Semences) âgées de 6 à 10 semaines. Les segments sont désinfectés par trempage pendant 30 min dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 %.

Les segments de pétioles sont ensuite placés dans un tube contenant du milieu de culture de Murashige et Skoog gélosé. L'inoculation de l'extrémité de ces segments est effectuée par dépôt d'une suspension de la souche d'Agrobacterium rhizogenes contenant le plasmide pBR1.

Des racines transformées apparaissent ensuite sur le segment de pétiole au bout de 1 mois environ. Ces racines sont prélevées et placées sur le milieu M gélosé (milieu M auquel on a ajouté 6 g/l d'agarose), complémenté par 500 µg de céfotaxime/ml. La composition du milieu M est explicitée par la suite (tableau 4). Ces racines sont repiquées chaque semaine pendant 4 semaines sur le même milieu. Elles sont ensuite transférées sur le milieu M liquide, afin d'obtenir la production de racines en quantité suffisante pour analyser l'expression de la protéine recombinante par la technique de Western blot selon le protocole décrit dans le paragraphe 3 de l'exemple 9. Les extraits bruts de protéines destinés à cette analyse sont préparés selon la technique décrite dans l'exemple 5. Les empreintes obtenues montrent la présence d'une protéine du poids moléculaire attendu (26 kDa) pour les racines transformées, absente dans les racines et feuilles de plantes de tournesol témoins (plantes non transformées).

30

35

Tableau 4

05 COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE M UTILISE POUR LA CULTURE DES
RACINES TRANSFORMEES DE TOURNESOL

	Composition mg/ml
10	NH_4NO_3 330
	KNO_3 380
	KH_2PO_4 170
	MgSO_4 370
	CaCl_2 440
15	H_3BO_3 6,3
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,6
	KI 0,83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25
20	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025
	Pyridoxine HCl 0,1
	Acide nicotinique 0,1
	Glycine 0,4
25	Inositol 20
	Thiamine 0,02
	Saccharose 30,000
	Citrate de fer 200

30

35

LISTE DES SEQUENCES

SEQ ID NO : 1

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 254 acides aminés

PROPRIETES : protéine à activité endochitinase

Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met
 1 5 10 15

Leu Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg Ser Phe Pro Gly Phe Gly
 35 40 45

Thr Ser Gly Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe
 50 55 60

Ala Gln Thr Ser His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp
 65 70 75 80

Gly Pro Phe Ala Trp Gly Tyr Cys Phe Leu Arg Glu Arg Gly Asn Pro
 85 90 95

Gly Asp Tyr Cys Ser Pro Ser Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg
 100 105 110

Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro Ile Gln Ile Ser His Asn Tyr Asn Tyr
 115 120 125

Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp
 130 135 140

Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe
 145 150 155 160

Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Ile
 165 170 175

Gly Arg Trp Asn Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ala Asn Arg Leu Pro
 180 185 190

Gly Phe Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly
 195 200 205

Arg Gly Asn Asp Asn Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg
 210 215 220

Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp Cys Gly
 225 230 235 240

Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met
 245 250

SEQ ID NO : 2

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 51 acides aminés

PROPRIETES : séquence située immédiatement en amont de
la séquence SEQ ID NO : 1

Gln	Asn	Cys	Gly	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Ala	Ser	Gly	Gln	Cys
-50						-45					-40					-35
Cys	Ser	Lys	Phe	Gly	Trp	Cys	Gly	Asn	Thr	Asn	Asp	His	Cys	Gly	Ser	Gly
				-30					-25					-20		
Asn	Cys	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Val	Thr
		-15					-10				-5					-1

SEQ ID NO : 3

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 24 acides aminés

PROPRIETES : séquence située immédiatement en amont de
la séquence SEQ ID NO : 2

Met	Arg	Arg	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Thr	Phe	Ser	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Val
-75					-70					-65					-60	
Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ala										
			-55			-52										

SEQ ID NO : 4

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 1153 paires de bases
 NOMBRE DE BRINS : à double brin
 TYPE DE MOLECULE : ADN génomique
 PROPRIETES : partie codante du gène chimérique, codant
 pour une protéine à activité endochitinase
 qui comprend la séquence SEQ ID NO : 1
 CARACTERISTIQUES : de 443 à 521 paires de bases : intron 1
 de 676 à 756 paires de bases : intron 2

```

ATGAGGCGAA CTTCTAAATT GACTACTTTT TCTTTGCTGT TTTCTCTGGT TTTGCTGAGT   60
GCTGCCTTGG CACAGAATTG TGGTTCACAG GCGGGAGGCA AAGTTTGTGC GTCGGGACAA   120
TGTTGCAGCA AATTCGGGTG GTGCGGTAAC ACTAATGACC ATTGTGGTTC TGGCAATTGT   180
CAAAGTCAGT GTCCAGGTGG CGGCCCTGGT CCTGGTCCTG TTAGTGGTGG GGACCTCGGA   240
AGCGTCATCT CAAATTCTAT GTTTGATCAA ATGCTTAAGC ATCGTAACGA AAATTCTTGT   300
CAAGGAAAGA ATAATTTCTA CAGTTACAAT GCCTTTATTA CTGCTGCTAG GTCTTTTCCT   360
GGCTTTGGTA CAAGTGGTGA TATCAATGCC CGTAAAAGGG AAATTGCTGC TTTCTTTGCC   420
CAAACCTCCC ATGAAACTAC TGGTATGTGT ATAACCATTG ACATCGAACC ATTAATAATAT   480
AATTTCAATT TATTTTATTT AGTAATTGAT TATATATGTA GGAGGATGGC CTTCCGCACC   540
TGATGGACCA TTCGCATGGG GTTACTGTTT CCTTAGAGAA CGAGGTAACC CCGGTGACTA   600
CTGTTACCA AGTAGTCAAT GGCCTTGTGC ACCTGGAAGG AAATATTTTG GACGAGGCCC   660
AATCCAAATT TCACAGTAAG CTACATAAAT CTATATATGG TAAAATTTGA TGAACCTGTA   720
GTGTCTAATT ACGTGTATTT TGACATTTCA AAACAGCAAC TACAACTATG GGCCATGTGG   780
AAGAGCCATC GGAGTGGACC TTTTAAACAA TCCTGATTTA GTAGCCACAG ACCCAGTCAT   840
CTCATTCAAG ACTGCTATCT GGTTCGGAT CACCCCTCAA TCACCAAAGC CTTCTTGCCA   900
CGATGTCATC ATTGGAAGAT GGAACCCATC TGCCGGTGAC CGATCAGCCA ATCGTCTTCC   960
TGGATTTGGT GTCATCACAA ACATCATCAA TGGGGGCCCT JAATGTGGTC GTGGCAATGA  1020
CAATAGGGTC CAGGATCGCA TTGGGTTTTA CAGGAGGTAT TGCGGTATTC TTGGTGTTAG  1080
TCCTGGTGAC AATCTTGATT GCGGAAACCA GAGATCTTTT GGAAACGGAC TTTTAGTCGA  1140
TACTATGTAA TGA                                     1153
  
```

SEQ ID NO : 5

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : paires de bases

NOMBRE DE BRINS : à double brin

TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

PROPRIETES : partie 5' du gène de l'endochitinase de tomate

CARACTERISTIQUES : 1^{re} paire de bases : site EcoRI
2006^o paire de bases : site StyI
2172^o paire de bases : site DraI (1)
2934^o paire de bases : site DraI (2)
3007^o paire de bases : site HindIII
de 1942 à 3007 paires de bases : partie 5'
de l'endochitinase de tomate
de 2384 à 2462 paires de bases : intron 1
de 2617 à 2697 paires de bases : intron 2

GAATTCATAT TTATTTTAAA AAAATATTTT CAACTTCAAA AATATATTTT TTTCACGCCT 60
ACCCTCGACC CCCCTCCCGC ACCCTTACCC GCCCTCTACC AACCCCCCCC CCCCCAAAAA 120
AAAATAAATT AAACTTTACT TTAAAAATA TTTTCAACTT CAAAATTTCA TTTTTTTTCA 180
TCCCTACCCT CGACCACCCC CACCCTCCCG CTAAAAAATA AAAGTTTAAG TTTGTTTTTG 240
AAAAGTATTT TCAACTTCAA AAATTCATTT TTTCACCCCT AACCTCAACC CCCCACCCAC 300
ATTCCCACCC CAATTTTTTT TTTTAAGTTT GTTGTTAAAA AATATTTTCT ACTTCAAAAT 360
TTCATTTTAC CCTTTCCCCC CCCCCTCCCC AAACCCCACC CCACCCCCC ACCCCCCAAA 420
AAAAATATTT AAATTTGTTT TAAAAAATA TTTTCAATTT CAAAATTTTA TTTTCTATTC 480
TAGTAAAAAT AAAAGATATA TCTCAAAAAC ATTTTTTACT TATTCAAAAA CCAACACTC 540
TTTTCCAGAA AAAATTTCTA TTCACCAACC AAATATGAGA AAATAAATCA AAATCTAGTT 600
ATTTTAGAAA ATGTTTTCTT ACATATCAAA CACACCCAAT GTCTTCATTA ATGTGTTTCAG 660
ATTTATTTTA TGTCAACTTG GTCGCTATGT TATATGAATT AGCCACACAA ATTCAATTTA 720
ATTGCACATT ACCACTATTT TGTAGTTCAC GTAGAAATTA AAGTTCATCA CAACAAAATA 780
AATATTGGGC GCACGGGCGA CTCCCCACTA GTATCACTCA GAAATCACAA TAAAGTATTA 840
AATTTTGTCA AAATTTCTTA TCCGTATTAA GAAATCTTTG AAGTCTGAAT ACATATAAAT 900
TCATAATTCA TAAATTTCAA ATTTCTCTTA GTAATTTTTA TTGAGTTATT AATTTCAATT 960
AAACAAATTC ATTGTACTTT GTAAATACTC CTAATTTGTA TGATTTTGGA CTCATGTAAG 1020
GAAACCTTAT CAAATTAAGT ATGGAGTTAA AGGGGAAGAG TAGAATTAGC AGCCCAAAGA 1080
TACACTTTCA AATTATGTAA GTTTGACCCA GCCTGCCCTA TTTCTTCTAG CACCAGCTGC 1140
TACCTTATAT AATTACTTTA ATTTGAAAAT GTCATCAATA TCATGCAAAA TTTACCGGCC 1200
CTATTTCTTC TAGCACTAGC TACTACCTTA TATAATTACT TTAATTTGTA AGTGTCTATCA 1260
ATATCATGCA AAATTTAGTC AAAATATTTA TCTCCATGTC TTTGGTTCTC AAATAGAGCA 1320
AATAGACTCA GACTCGAACC TACGCAAGTG TAAAAGCAAG GAATGATTAC CAAACAAGAC 1380
AGTTCTCAAC AAGCAACAAA ATAAACAAGG CAAAAC TAGTAAACGA ATGCTATTGT 1440
CATTCCAGCC GAACTAACAA TAACCTACAT ACAAACCAGT TCAACCTTTA GCTTTACTTT 1500
TACCATTTTT GGCTCTTTTG TTAATTGAGA TTTGAAATAA ATCTCAACAA TAATTTATTT 1560
ATGATCCACA TGACATTAGT CTAAGAGGTG ATTGAACATT ACTTGAGAGA TATTGCTATT 1620
CGATGAGTTA CATAGTTTTT CACTACAAAT TTAATTTACT CTAATATGA ATATTATAAT 1680
TTGTAGTACA GTTTTTATTT AATAGGTAAA TTTAATAAGA GTAAACAAAA AATATCCAGC 1740
AACTATAGTC TCCAGTCCAA ATTATGTAGA GAAAAGTCTG GAATAACGTC CAAAGCCGCC 1800
CGTCTCTTTT ACTTATAACT GAATTAAATT CTGGATACCA CAGGGTGGAC TATCAATTTT 1860
GTCATAAAAG TCACTGATTC CTCACAACCA CTTGCCTATA AATAGCTTTC ACTTTAGCAT 1920

BNSDOCID: <WO 8201782A1 | >

TTGTAGTGTG TAATTACGTG TATTTTGACA TTTCAAACA G C AAC TAC AAC TAT GGG
s Asn Tyr Asn Tyr Gly
200

CCA TGT GGA AGA GCC ATC GGA GTG GAC CTT TTA AAC AAT CCT GAT TTA GTA
Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp Leu Val
205 210 215 220

GCC ACA GAC CCA GTC ATC TCA TTC AAG ACT GCT ATC TGG TTC TGG ATG ACC
Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe Trp Met Thr

CCT CAA TCA CCA AAG CCT TCT TGC CAC GAT GTC ATC ATT GGA AGA TGG AAC
Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Ile Gly Arg Trp Asn
240 245 250 255

CCA TCT GCC GGT GAC CGA TCA GCC AAT CGT CTT CCT GGA TTT GGT GTC ATC
Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ala Asn Arg Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile
260 265 270

ACA AAC ATC ATC AAT GGG GGC CTA GAA TGT GGT CGT GGT AAT GAC AAC AGG
Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly Arg Gly Asn Asp Asn Arg
275 280 285

GTA CAA GAT CGA ATT GGA TTT TAC AGG AGG TAT TGC GGA AGCTT
Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg Tyr Cys Gly
290 295 300 302

SEQ ID NO : 6

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 71 paires de bases
NOMBRE DE BRINS : double brin
ORIGINE : synthétique
TYPE DE MOLECULE : ADN génomique
PROPRIETES : oligonucléotide
CARACTERISTIQUES : 1^e paire de base : site BamHI

GGATCCATGA GGCGAAGCTTC TAAATTGACT ACTTTTCTT TGCTGTTTTC TCTGGTTTTC
CTGAGTGCTG C

SEQ ID NO : 7

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique
LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 164 paires de bases
NOMBRE DE BRINS :
ORIGINE : synthétique
TYPE DE MOLECULE : ADN chimérique
CARACTERISTIQUES : de 1 à 71 paires de bases : séquence de
l'ADN génomique de l'endochitinase de
tomate
de 72 à 154 paires de bases : séquence
proche de la partie 3' de la séquence
de l'ADNc d'endochitinase de tabac
163^e paire de bases : site SacI

GGCCTGGAAT GTGGTCGTGG CAATGACAAT AGGGTCCAGG ATCGCATTGG GTTTTACAGG 60
AGGTATTGCG GTATTCTTGG TGTTAGTCCT GGTGACAATC TTGATTGCGG AAACCAGAGA 120
TCTTTTGGAA ACGGACTTTT AGTCGATACT ATGTAATGAG CTC 164

SEQ ID NO : 8

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 1863 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : à double brin

TYPE DE MOLECULE : hybride (ADN génomique - ADN complément-
taire)

PROPRIETES : séquence du gène chimérique complet

CARACTERISTIQUES : 438^e paire de base : ATG d'initiation de
la traduction
1585^e paire de base : TAA de terminaison
de la traduction
de 880 à 958 paires de bases : intron 1
de 1113 à 1193 paires de bases : intron 2

AAGCTTGCAC GACACACTTG TCTACTCCAA AAATATCAAA GATACAGTCC TCAGAAGACC	60
AAAGGGCCAA TTGAGACTTT TCAACAAAGG GTAATATCCG GAAACCTCCT CGGATTCCAT	120
TGCCCAGCTA TCTGTCACTT TATTGTGAAG ATAGTGGAAA AGGAAGGTGG CTCCTACAAA	180
TGCCATCATT GCGATAAAGG AAAGGCCATC GTTGAAGATG CCTCTGCCGA CAGTGGTCCC	240
AAAGATGGAC CCCACCCAC GAGGAGCATC GTGGAAAAAG AAGACGTTCC AACCACGTCT	300
TCAAAGCAAG TGGATTGATG TGATATCTCC ACTGACGTAA GGGATGACGC ACAATCCCAC	360
TATCCTTCGC AAGACCCTTC CTCTATATAA GGAAGTTCAT TTCATTTGGA GAGAACACGG	420
GGGACTCTAG AGGATCCATG AGGCGAACTT CTAAATTGAC TACTTTTTCT TTGCTGTTTT	480
CTCTGGTTTT GCTGAGTGCT GCCTTGGCAC AGAATTGTGG TTCACAGGGC GGAGGCAAAG	540
TTTGTGCGTC GGGACAATGT TGCAGCAAAT TCGGGTGGTG CGGTAACACT AATGACCATT	600
GTGGTTCTGG CAATTGTCAA AGTCAGTGTC CAGGTGGCGG CCCTGGTCCT GGTCTGTGTA	660
CTGGTGGGGA CCTCGGAAGC GTCATCTCAA ATTCTATGTT TGATCAAATG CTTAAGCATC	720
GTAACGAAAA TTCTTGTCOA GGAAAGAATA ATTTCTACAG TTACAATGCC TTTATTACTG	780
CTGCTAGGTC TTTTCCTGGC TTTGGTACAA GTGGTGATAT CAATGCCCGT AAAAGGGAAA	840
TTGCTGCTTT CTTTGCCCAA ACCTCCCATG AAACACTGG TATGTGTATA ACCATTCA	900
TCGAACCATT AAAATATAAT TTCATTTTAT TTTATTTAGT AATTGATTAT ATATGTAGGA	960
GGATGGCCTT CCGCACCTGA TGGACCATTG GCATGGGGTT ACTGTTTCCT TAGAGAACGA	1020
GGTAACCCCG GTGACTACTG TTCACCAAGT AGTCAATGGC CTTGTGCACC TGGAAGGAAA	1080
TATTTCCGAC GAGGCCCAAT CCAAATTTCA CAGTAAGCTA CATAAATCTA TATATGGTAA	1140
AATTTGATGA ACTTGTAAGT TCTAATTACG TGTATTTTGA CATTTCAAAA CAGCAACTAC	1200
AACTATGGGC CATGTGGAAG AGCCATCGGA GTGGACCTTT TAAACAATCC TGATTTAGTA	1260
GCCACAGACC CAGTCATCTC ATTCAAGACT GCTATCTGGT TCTGGATGAC CCCTCAATCA	1320
CCAAAGCCTT CTTGCCACGA TGTCATCATT GGAAGATGGA ACCCATCTGC CGGTGACCGA	1380
TCAGCCAATC GTCTTCCTGG ATTTGGTGTC ATCACAAACA TCATCAATGG GGGCCTGGAA	1440
TGTGGTCGTG GCAATGACAA TAGGGTCCAG GATCGCATTG GGTTTTACAG GAGGTATTGC	1500
GGTATTCTTG GTGTTAGTCC TGGTGACAAT CTTGATTGCG GAAACCAGAG ATCTTTTGGA	1560
AACGGACTTT TAGTCGATAC TATGTAATGA GCTCGAATTT CCCCATCGT TCAAACATTT	1620
GGCAATAAAG TTTCTTAAGA TTGAATCCTG TTGCCGGTCT TGCATGATT ATCATATAAT	1680
TTCTGTTGAA TTACGTTAAG CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACG TTATTTATGA	1740
GATGGGTTTT TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACGCGATA GAAAACAAAA	1800
TATAGCGCGC AAAC TAGGAT AAATTATCGC GCGCGGTGTC ATCTATGTAA CTAGATCGAA	1860
TTC	1863

51

SEQ ID NO : 9

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 22 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple brin

ORIGINE : synthétique

TYPE DE MOLECULE : ADN

PROPRIETES : sonde (marquée au 32-dcTP)

AGGGCCGCCA CCTGGACACT GA

SEQ ID NO : 10

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 20 acides aminés

PROPRIETES : peptide N-terminal

Gly Gly Xaa Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Xaa Met Phe Xaa Gln Met
1 5 10 15

Leu Lys Xaa Arg
20

SEQ ID NO : 11

TYPE DE SEQUENCE : nucléotidique

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 1163 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : à double brin

TYPE DE MOLECULE : hybride (ADN génomique - ADN complémentaire)

PROPRIETES : séquence codante du gène chimérique

CARACTERISTIQUES : 2^e paire de bases : site BamHI
1162^o paire de bases : site SacI
de 7 à 78 paires de bases : séquence 3
de 79 à 231 paires de bases : séquence 2
de 232 à 1153 paires de bases : séquence 1
de 449 à 527 paires de bases : intron 1
de 682 à 762 paires de bases : intron 2

53

GGATCC ATG AGG CGA ACT TCT AAA TTG ACT ACT TTT TCT TTG CTG TTT TCT
 Met Arg Arg Thr Ser Lys Leu Thr Thr Phe Ser Leu Leu Phe Ser
 -75 -70 -65

CTG GTT TTG CTG AGT GCT GCC TTG GCA CAG AAT TGT GGT TCA CAG GGC GGA
 Leu Val Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ala Gln Asn Cys Gly Ser Gln Gly Gly
 -60 -55 -50 -45

GGC AAA GTT TGT GCG TCG GGA CAA TGT TGC AGC AAA TTC GGG TGG TGC GGT
 Gly Lys Val Cys Ala Ser Gly Gln Cys Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly
 -40 -35 -30

AAC ACT AAT GAC CAT TGT GGT TCT GGC AAT TGT CAA AGT CAG TGT CCA GGT
 Asn Thr Asn Asp His Cys Gly Ser Gly Asn Cys Gln Ser Gln Cys Pro Gly
 -25 -20 -15 -10

GGC GGC CCT GGT CCT GGT CCT GTT ACT GGT GGG GAC CTC GGA AGC GTC ATC
 Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro Val Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile
 -5 -1 1 5

TCA AAT TCT ATG TTT GAT CAA ATG CTT AAG CAT CGT AAC GAA AAT TCT TGT
 Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met Leu Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys
 10 15 20 25

CAA GGA AAG AAT AAT TTC TAC AGT TAC AAT GCC TTT ATT ACT GCT GCT AGG
 Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg
 30 35 40

TCT TTT CCT GGC TTT GGT ACA AGT GGT GAT ATC AAT GCC CGT AAA AGG GAA
 Ser Phe Pro Gly Phe Gly Thr Ser Gly Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu
 45 50 55

ATT GCT GCT TTC TTT GCC CAA ACC TCC CAT GAA ACT ACT G GTATGTGTAT
 Ile Ala Ala Phe Phe Ala Gln Thr Ser His Glu Thr Thr G
 60 65 70

AACCATTAC ATCGAACCAT TAAATATAA TTTTATTTTA TTTTATTTAG TAATTGATTA

TATATGTAG GA GGA TGG CCT TCC GCA CCT GAT GGA CCA TTC GCA TGG GGT
 ly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp Gly Pro Phe Ala Trp Gly
 75 80 85

TAC TGT TTC CTT AGA GAA CGA GGT AAC CCC GGT GAC TAC TGT TCA CCA AGT
 Tyr Cys Phe Leu Arg Glu Arg Gly Asn Pro Gly Asp Tyr Cys Ser Pro Ser
 90 95 100

AGT CAA TGG CCT TGT GCA CCT GGA AGG AAA TAT TTC GGA CGA GGC CCA ATC
 Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro Ile
 105 110 115 120

CAA ATT TCA CA GTAAGCTACA TAAATCTATA TATGGTAAAA TTTGATGAAC
 Gln Ile Ser Hi

TTGTAGTGTC TAATTACGTG TATTTTGACA TTTCAAAACA G C AAC TAC AAC TAT GGG
 s Asn Tyr Asn Tyr Gly
 125

CCA TGT GGA AGA GCC ATC GGA GTG GAC CTT TTA AAC AAT CCT GAT TTA GTA
 Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp Leu Val
 130 135 140 145

GCC ACA GAC CCA GTC ATC TCA TTC AAG ACT GCT ATC TGG TTC TGG ATG ACC
 Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe Trp Met Thr
 150 155 160

CCT CAA TCA CCA AAG CCT TCT TGC CAC GAT GTC ATC ATT GGA AGA TGG AAC
 Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Ile Gly Arg Trp Asn
 165 170 175 180

CCA TCT GCC GGT GAC CGA TCA GCC AAT CGT CTT CCT GGA TTT GGT GTC ATC
 Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ala Asn Arg Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile
 185 190 195

ACA AAC ATC ATC AAT GGG GGC CTG GAA TGT GGT CGT GGC AAT GAC AAT AGG
 Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly Arg Gly Asn Asp Asn Arg
 200 205 210

GTC CAG GAT CGC ATT GGG TTT TAC AGG AGG TAT TGC GGT ATT CTT GGT GTT
 Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val
 215 220 225 230

AGT CCT GGT GAC AAT CTT GAT TGC GGA AAC CAG AGA TCT TTT GGA AAC GGA
 Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp Cys Gly Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly
 235 240 245

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA TGA GCTC
 Leu Leu Val Asp Thr Met End End
 250 255

REVENDICATIONS

1. Gène recombinant, caractérisé en ce qu'il code pour
une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de
cette dernière, qui comprend la séquence (1) ci-après :

Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met Leu
Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr Ser Tyr
Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg Ser Phe Pro Gly Phe Gly Thr Ser Gly
10 Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe Ala Gln Thr Ser
His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp Gly Pro Phe Ala Trp
Gly Tyr Cys Phe Leu Arg Glu Arg Gly Asn Pro Gly Asp Tyr Cys Ser Pro
Ser Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro
Ile Gln Ile Ser His Asn Tyr Asn Tyr Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly
15 Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser
Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser
Cys His Asp Val Ile Ile Gly Arg Trp Asn Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser
Ala Asn Arg Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly
Leu Glu Cys Gly Arg Gly Asn Asp Asn Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe
20 Tyr Arg Arg Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp
Cys Gly Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met.

2. Gène recombinant selon la revendication 1, caractérisé
en ce qu'il code pour une protéine qui comprend, immédiatement en
amont de la séquence (1), la séquence (2) ci-après :

Gln Asn Cys Gly Ser Gln Gly Gly Gly Lys Val Cys Ala Ser Gly Gln Cys
Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly Asn Thr Asn Asp His Cys Gly Ser Gly
Asn Cys Gln Ser Gln Cys Pro Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro Val Thr
30

ou une séquence présentant un degré d'homologie substantiel avec la
séquence (2).

3. Gène recombinant selon l'une des revendications 1 et
2, caractérisé en ce qu'il code pour une protéine dont la séquence
comprend, en amont de la séquence (1), une séquence codant pour un
peptide-signal.

4. Gène recombinant selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il code pour une protéine dont la séquence comprend, immédiatement en amont de la séquence (2) ou de la séquence présentant un degré d'homologie substantiel avec la séquence (2), la séquence (3) ci-après :

Met Arg Arg Thr Ser Lys Leu Thr Thr Phe Ser Leu Leu Phe Ser Leu Val
Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ala

ou une séquence présentant un degré d'homologie substantiel avec la séquence (3).

5. Gène recombinant codant selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que sa partie codante comprend au moins une partie 5' de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire de l'endochitinase de tomate et au moins une partie 3' de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire de l'endochitinase de tabac.

6. Gène recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que la partie codante comprend au moins un intron.

7. Gène recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que sa partie codante est la séquence ci-après :

ATGAGGCGAA CTTCTAAATT GACTACTTTT TCTTTGCTGT TTTCTCTGGT
TTTGCTGAGT GCTGCCTTGG CACAGAATTG TGGTTCACAG GCGGGAGGCA
AAGTTTGTGC GTCGGGACAA TGTTCGAGCA AATTCGGGTG GTCCGGTAAC
ACTAATGACC ATTGTGGTTC TGGCAATTGT CAAAGTCAGT GTCCAGGTGG
CGGCCCTGGT CCTGGTCCTG TTA CTGGTGG GGACCTCGGA AGCGTCATCT
CAAATTCTAT GTTTGATCAA ATGCTTAAGC ATCGTAACGA AAATTCTTGT
CAAGGAAAGA ATAATTTCTA CAGTTACAAT GCCTTTATTA CTGCTGCTAG
GTCTTTTCCT GGCTTTGGTA CAAGTGGTGA TATCAATGCC CGTAAAAGGG
AAATTGCTGC TTTCTTTGCC CAAACCTCCC ATGAAACTAC TGGTATGTGT
ATAACCATTC ACATCGAACC ATTAAAATAT AATTTTATTT TATTTTATTT
AGTAATTGAT TATATATGTA GGAGGATGGC CTTCCGCACC TGATGGACCA
TTCCGATGGG GTTACTGTTT CCTTAGAGAA CGAGGTAACC CCGGTGACTA

CTGTTACCA AGTAGTCAAT GGCCTTGTGC ACCTGGAAGG AAATATTTCC
 GACGAGGCCC AATCCAAATT TCACAGTAAG CTACATAAAT CTATATATGG
 TAAAATTTGA TGAACCTGTA GTGTCTAATT ACGTGTATTT TGACATTTCA
 05 AACAGCAAC TACAACTATG GGCCATGTGG AAGAGCCATC GGAGTGGACC
 TTTTAAACAA TCCTGATTTA GTAGCCACAG ACCCAGTCAT CTCATTCAAG
 ACTGCTATCT GGTTCCTGGAT GACCCCTCAA TCACCAAAGC CTTCTTGCCA
 CGATGTCATC ATTGGAAGAT GGAACCCATC TGCCGGTGAC CGATCAGCCA
 10 ATCGTCTTCC TGGATTTGGT GTCATCACAA ACATCATCAA TGGGGGCCTG
 GAATGTGGTC GTGGCAATGA CAATAGGGTC CAGGATCGCA TTGGGTTTTA
 CAGGAGGTAT TGCGGTATTC TTGGTGTTAG TCCTGGTGAC AATCTTGATT
 15 GCGGAAACCA GAGATCTTTT GGAAACGGAC TTTTAGTCGA TACTATGTAA
 TGA

8. Gène recombinant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence promotrice comportant le promoteur 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur.

20 9. Gène recombinant selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence terminatrice comportant le terminateur de la nopaline synthase d'Agrobacterium tumefaciens.

25 10. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un gène recombinant selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Cellule végétale selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

30 12. Plante ou partie de plante caractérisée en ce qu'elle contient, dans un contexte susceptible de permettre son expression, un gène recombinant selon l'une des revendications 1 à 9.

35 13. Plante ou partie de plante selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

14. Partie de plante selon l'une des revendications 12 et 13, caractérisée en ce qu'elle est une semence.

05 15. Procédé pour obtenir des plantes résistantes aux agents pathogènes caractérisée en ce qu'il comprend une étape de transformation de cellules végétales par un gène recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, suivie d'une étape de multiplication des cellules transformées et d'une étape de régénération des plantes.

10 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'il est appliqué à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

17. Protéine à activité endochitinase caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence (1).

15 18. Procédé pour obtenir la protéine selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture de cellules ou de cals végétaux contenant, dans un contexte susceptible de permettre son expression, un gène recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, la lyse de ceux-ci, l'isolement et la purification de cette protéine.

20 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que les cellules ou les cals végétaux sont choisis dans l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

1/17



FIGURE.1 : Carte de restriction du fragment d'ADN génomique de l'endochitinase de tomate d'environ 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.

2/17

EcoRI
↓
GAATTCATATTATTTTAAAAAATATTTTCAACTTCAAAAAATATATTTTTCACGCCT
ACCCTCGACCCCTCCCGCACCCCTTACCCGCCCTCTACCAACCCCTCCCTCCCAAAA
AAAAATAAAGTTTACTTTTAAAAATATTTTCAACTTCAAAAATTTCATTTTTCATCA
TCCCTACCCCTCGACCCACCCCTCCCGCTAAAAAATAAAGTTTAAGTTTGTGTTTG
AAAAGTATTTTCAACTTCAAAAATTCATTTTTCACCCCTAACCTCAACCCCTCCACCCAC
ATTCCCACCCCAATTTTATTTTAAAGTTTGTTGTTAAAAAATATTTTCTACTTCAAAAT
TTCAATTCACCCCTTCCCTCCCTCCCAACCCCAACCCCTCCCTCCCTCCCTCCCAAA
AAAAATATTAAATTTGTTTAAAAAATAATTTTCAATTTCAAAAATTTTATTTTCTATTC
TAGTAAAAATAAAGATATATCTCAAAAACATTTTCTACTTATTCAAAAACCAACACTC
TTTCCAGAAAAAATTTCTATTCACCAACCAAAATATGAGAAAAATAATCAAAATCTAGTT

FIGURE.2 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN génomique
de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.

3 / 17

ATTTAGAAAATGTTTCCCTACATATCAAACACACCCCAATGTCTTCATTAAATGTGTTTCAG
ATTTATTTATGTCAACTTGGTCGCTATGTATATGAATTAGCCACACAAATTCAATTTA
ATTGCACATTACCCTATTTTGTAGTTCACGTAGAAATTAAGTTTCATCACAACAAAATA
AATATTGGGCGACGGGCGACTCCCCACTAGTATCACTCAGAAATCACAATAAAGTATTA
AATTTGTCAAAAATTCTTTATCCGCTATTAAGAAATCTTTGAAGTCTGAATACATATAAAT
TCATAATTCAATAATTTCATAATTCTCTTAGTAAATTTTATTGAGTTATTAAATTTCAATTT
AAACAAATTCTGTTGTTGTAATACTCCTAAATTTGTATGATTTTGGACTCATGTAAG
GAAACCTTATCAAAATTAAGTATGGAGTTAAAGGGGAGAGTAGAATTAGCAGCCCAAGA
TACACTTCAAAATTAATGTAAGTTTGACCCAGCCCTGCTTCTTCTAGCACCAGCTGC
TACCTTATAAATTACTTTAAATTTGAAAATGTCATCAATATCATGCAAAATTACCGGCC
CTATTTCTTAGCCTAGCTACTACCTTATATAATTACTTTAAATTTGTAAGTGTCAATCA

FIGURE.2 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN génomique
(suite 1) de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.

4 / 17

ATATCATGC AAAATTAGTCAAATAATTAATCTCGATGTCTTTGGTTCTCAAATAGAGCA
AATAGACTCAGACTCGAACCTACGCAAGTGTAAGCAAGGAATGATTACCAACAAGAC
AGTCTCAACAAGCAACAAAATAACAAGGCAAACTAGTTAGAAACGAATGCTATTGT
CATTCCAGCCGAACTAACAATAACCTACATACAACCAAGTTCAACCTTTAGCTTTACTTT
TACCATTTTGGCTCTTTTGTAAATTGAGATTGAAATAAATCTCAACAATAATTATT
ATGATCCACATGACATTAGTCTAAGAGGTGATTGAACATTACTTGAGAGATATTGCTATT
CGATGAGTTACATAGTTTCCACTACAAATTAAATTACTCTAACTATGAATATTATAAT
TTGTAGTACAGTTTATTAAATAGGTAAATTAAATAAGAGTAAACAATAATCCAGC
AACTATAGTCTCCAGTCCAAATTATGTAGAGAAAGCTCTGGAATAACGTCCAAAGCCGCC
CGTCTCTTTTACTTATAACTGAATTAAATTCTGGATACGACAGGGTGACTATCAATTTT
GTCATAAAGTCACTGATTCCCTCACAAACCCTTGCCCTATAAATAGCTTTCACTTTAGCAT

FIGURE.2 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN génomique
(suite 2) de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.

5/17

TTGTTGCCATCACAATCAAAATGAGGCGAACTTCTAAATGACTACTTTTCTTTGCTG
MetArgArgThrSerLysLeuThrThrPheSerLeuLeu

StyI 2006
↓

TTTCTCTGGTTTGTGCTGAGTGCTGCCCTTGGCACAGAAATTGTGTTCAAGGCGGAGGC
PheSerLeuValLeuSerAlaAlaLeuAlaGlnAsnCysGlySerGlnGlyGly

AAAGTTCTGCGTCCGGACAAATGTTGCAGCAAATTCGGTGGTCCGGTAACACTAATGAC
LysValCysAlaSerGlyGlnCysCysSerLysPheGlyTrpCysGlyAsnThrAsnAsp

CATTGTGTTCTGGCAATTGTCAAAGTCAGTGTCCAGTGCGCGCCCTGGTCCCTGGTCCT
HisCysGlySerGlyAsnCysGlnSerGlnCysProGlyGlyProGlyProGlyPro

DraII(1)
↓

GTTACTGGTGGGACCTCGCAAGCGTCATCTCAAATTCTATGTTTCATCAAAATGCTTAAG
ValThrGlyGlyAspLeuAlaSerValIleSerAsnSerMetPheAspGlnMetLeuLys

CATCGTAACGAAAATTCTTGTCAAGGAAGAATAATTCTACAGTTACAATGCCCTTATT
HisArgAsnGluAsnSerCysGlnGlyLysAsnAsnPheTyrSerTyrAsnAlaPheIle

FIGURE.2 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN génomique
(suite 3) de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.

6/17

ACTGCTAGGCTTTTCCCTGGCTTGGTACAAGTGGTGATATCAATGCCCGTAAAGG
 ThrAlaAlaArgSerPheProGlyPheGlyThrSerGlyAspIleAsnAlaArgLysArg

GAAATTGCTGCTTTTCCCTCCCAACCTCCCATGAACACTACTGGTATGTGTATAACCAT
 GluIleAlaAlaPhePheAlaGlnThrSerHisGluThrGCTTTT

CACATCGAACCATTAATAATTTTCATTTTATTTATTTAGTAATTGATTATATATGT
 TTTT

AGGAGGATGGCCTTCCGCACCTGATGGACCATTCGCATGGGGTACTGTTTCCTTAGAGA
 ZzlyGlyTrpProSerAlaProAspGlyProPheAlaTrpGlyTyrCysPheLeuArgG1

ACGAGGTAACCCGGTGACTACTGTTCACCAAGTAGTCAATGGCCTTGTGCACCTGGAAG
 uArgGlyAsnProGlyAspTyrCysSerProSerSerGlnTrpProCysAlaProGlyAr

GAAATATTCCGACGAGCCCAATCCAAATTTCACAGTAAGCTACATAAATCTATATATG
 gLystyrPheGlyArgGlyProIleGlnIleSerHiZTTT

FIGURE.2 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN génomique
 (suite 4) de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.

TTTTT : intron

7/17

GTAAATTGATGAACCTGTAGTGTCTAATTACGTGTAATTTTGACATTTCAAAACAGCAA
 // SAS

CTACAACATATGGGCCATGTGGAAGAGCCATCGGAGTGGACCTTTTAAACAATCCTGATTT
 NTYFASNTYGLYPROCYSGLYARGALAIleGLYVALAsPLEuASNAsnPROAsPLE

AGTAGCCACAGACCCAGTCATCTCATTTCAAGACTGCTATCTGGTCTGTGATGACCCCTCA
 uValAlaThrAspProValIleSerPheLysThrAlaIleTrpPheTrpMetThrProGI

ATCACCAAAGCCTTCTTGCCACGATGTCAATCATTTGGAAGATGGAACCATCTGCCGGTGA
 nSerProLysProSerCysHisAspValIleIleGLYARGTrpAsnProSerAlaGLYAs

CCGATCAGCCAAATCGTCTTCTCGGATTGGTGTCAACAAACATCATCAATGGGGCCT
 PARGSerAlaAsnArgLeuProGLYPheGLYValIleThrAsnIleIleAsnGLYGLYLe
 ↓
 DraI(2)

AGAAATGTGGTGGTAAATGACAACAGGGTACAAGATCGAATTGGATTTTACAGGAGGTA
 uGLUCYSGLYARGGLYAsnAspAsnArgValGlnAspArgIleGLYPheTYrArgArgTY

Hind III 3007
 ↓

TTGCCGGAAGCTT
 rCYSGLY

FIGURE 2 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN génomique
 (suite 5) de tomate de 3,5 kb, inséré dans le plasmide pCH3.5.
 // : intron

```

1 .....TCTCT 5
1 ATGAGCGAAGTCTAAATGACTACTTTTCTTTGCTGTTTCTCTGGT 50
6 CCTACTCCTCTGCTGCGGAGCAATGTGGTTCGAGGGGAGGTG 55
  ||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
51 TTTGCTGAGTGTGCTGCTGCGGACAGAAATTGTGTTTACAGGGCGGAGGCA 100
56 CGCGTTGTGCTGCGGCTCTGCTGCAGCAAAATTGGTGTGGTAAC 105
  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
101 AAGTTGTGCTGCGGACAAATGTTGCAGCAAAATTCGGGTGTCGGTAAC 150
106 ACCAATGACTATTGTGGCCCTGGCAATTGCCAGAGCCAGTCCCTGGTGG 155
  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
151 ACTAATGACCAATTGTGTTCTGTCGCAATTGTCAAAGTCAGTGTCCAGGTGG 200
156 TCCCACACCCCGG.....TGGTGGGGATCTCGGCAGTATCATCT 196
  ||| ||| ||||| ||||| ||||| |||||
201 CGGCCCTGGTCCCTGGTCTGTTACTGTTGGGGACCTCGGAAGCGTCATCT 250

```

FIGURE.3 : Alignement d'après l'homologie maximale de l'ADNg de
l'endochitinase de tomate dépourvue des introns (ligne inférieure)
et de l'ADNe de l'endochitinase de tabac (ligne supérieure).

9/17

```

197 CAAGTCCATGTTGATCAGATGCTTAAGCATCGCAACGATAATGCATGC 246
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
251 CAAATTCTATGTTGATCAAAATGCTTAAGCATCGTAACGAAATTCTTGT 300

247 CAAGGAAAG...GGATTCTACAGTTACAATGCCCTTTATCAATGCTGCTAG 293
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
301 CAAGCAAAGAAATAATTCTACAGTTACAATGCCCTTTATTAAGTCTGCTAG 350

294 GTCTTTTCCCTGGCTTTGGTACTAGTGGTGATACCACCTGCCCGTAAAGAG 343
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
351 GTCTTTTCCCTGGCTTTGGTACAAGTGGTGATATCAATGCCCGTAAAGGG 400

344 AAATCGCGGCTTTCTTCGCCCAAACCTCCCATGAAACTACAGGAGGATGG 393
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
401 AAATTGCTGCTTTCTTTGCCCAAACCTCCCATGAAACTACTGGAGGATGG 450

394 GCAACAGCACCAAGATGGTCCATACGCCGTGGGGTTACTGCTGGCTTAGAGA 443
   | | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
451 CCTCCGCACCTGATGGACCAATTCGCATGGGGTTACTGTTTCCTTAGAGA 500

```

FIGURE.3 : Alignement d'après l'homologie maximale de l'ADNg de
(suite 1) l'endochitinase de tomate dépourvue des introns (ligne inférieure)
et de l'ADNe de l'endochitinase de tabac (ligne supérieure).

444 ACAAGGTAGCCCCGGCGACTACTGTACACCAAGTGGTCAAGTGGCCCTTGTC 493
 501 ACGAGGTAACCCCGGTGACTACTGTTCACCAAGTAGTCAATGGCCCTTGTC 550
 494 CTCCTGGTCGGAAATATTTCGGACGAGGCCCCCATCCAAATTTCACACAAC 543
 551 CACCTGGAAGGAAATATTTCGGACGAGGCCCAATCCAAATTTCACACAAC 600
 544 TACAACCTACGGACCTTGTGGAAGAGCCATAGGAGTGGACCTCCTAAACAA 593
 601 TACAACCTATGGCCCATGTGGAAGAGCCATCGGAGTGGACCTTTAAACAA 650
 594 TCCTGATTAGTGCCACAGATCCAGTAATCTCATTTCAAGTCAGCTCTCT 643
 651 TCCTGATTAGTAGCCACAGACCCAGTCATCTCATTTCAAGACTGCTATCT 700
 644 GGTTTGGATGACTCCTCAATCACCAAACCTTCTTGCCACGATGTCATC 693
 701 GGTTCGGATGACCCCTCAATCACCAAAGCCTTCTTGCCACGATGTCATC 750

FIGURE.3 : Alignement d'après l'homologie maximale de l'ADNg de l'endochitinase de tomate dépourvue des introns (ligne inférieure) et de l'ADNc de l'endochitinase de tabac (ligne supérieure).

11/ 17

```

694  ATTGGAAGATGGCAACCATCGTCTGCTGACCGCGCAGCCAATCGTCTCCC 743
      |||||
751  ATTGGAAGATGGAAACCCATCTGCCGGTGACCGCATCAGCCAATCGTCTTCC 800
      |||||

744  TGGATTGGTGTGTCATCAGGAACATCATCAATGGTGGCTTGGAATGTGGTC 793
      |||||
801  TGCATTGGTGTGTCATCACAACATCATCAATGGGGGCCCTGGAATGTGGTC 850
      |||||

794  GTGGCACTGACTCAAGGGTCCAGGATCGCAATGGGTTTACAGGAGGTAT 843
      |||||
851  CTCGCAATGACAATAAGGTCAGGATCGCAATGGGTTTACAGGAGGTAT 900
      |||||

844  TGCAGTATTCTTGGTGTAGTCCCTGGTGACAATCTTGATTGCCGGAACCA 893
      |||||
901  TCGCGG

894  GAGGTCTTTTGGAAACGGACTTTTAGTCCGATACTATGTAATTTATGGTC 943
      |||||

```

FIGURE 3 : Alignement d'après l'homologie maximale de l'ADNg de
 (suite 3) l'endochitinase de tomate dépourvue des introns (ligne inférieure)
 et de l'ADNc de l'endochitinase de tabac (ligne supérieure).

12/17

BamHI
 ↓
 GGATCCATGAGCGGAACCTTAAATTGACTACTTTTCTTCTGCTGTTTCTCTGCTTTTC
 MetArgArgThrSerLysLeuThrThrPheSerLeuLeuPheSerLeuValLeu
 ← Séquence 3
 CTGAGTCCTGCCACAGAAATTGTGGTTCACAGGCGGAGGCAAGTTTGTGCGCTCG
 LeuSerAlaAlaLeuAlaGlnAsnCysGlySerGlnGlyGlyGlyValCysAlaSer
 ← Séquence 2
 GGACAATGTTGCAGCAAAATTCGGGTGGTCCGGTAACACTAATGACCATTGTGTTCTGCGC
 GlyGlnCysCysSerLysPheGlyTrpCysGlyAsnThrAsnAspHisCysGlySerGly
 AATTGTCAAAGTCAGTGTCAGGTGGCGGCCCTGCTCCTGCTTACTGCTGGGAC
 AsnCysGlnSerGlnCysProGlyGlyGlyProGlyProGlyProValThrGlyGlyAsp
 CTGGGAAGCGTCATCTCAAATTCTATGTTGATCAAAATGCTTAAGCATCGTAACGAAAT
 LeuGlySerValIleSerAsnSerMetPheAspGlnMetLeuLysHisArgAsnGluAsn
 TCTTGTCAAGGAAGAAATAATTCTACAGTTACAATGCCCTTATTACTGCTGCTAGGTCT
 SerCysGlnGlyLysAsnAsnPheTyrSerTyrAsnAlaPheIleThrAlaAlaArgSer
 TTTCCTGGCTTTGGTACAAGTGGTGATATCAATGCCCCGTAAAGGGAATTGCTGCTTTC
 PheProGlyPheGlyThrSerGlyAspIleAsnAlaArgLysArgGluIleAlaAlaPhe

FIGURE 4 : Séquence codante du gène chimérique encadrée par les sites
 BamHI et SacI, et séquence d'acides aminés déduite.

13/17

```

TTTGGCCAAACCTCCCATGAACACTACTGGTATGTGTATAACCAATTCACATCGAACCATTA
PheAlaGlnThrSerHisGluThrThrG
=====
AAATATAATTTCATTTTATTATTAGTAATTGATTATATATGTAGGAGGATGGCCCTTC
=====
CGCACCTGATGGACCATTCCGCATGGGGTTACTGTTCCTTAGAGAACGAGTAACCCCGG
rAlaProAspGlyProPheAlaTrpGlyTyrCysPheLeuArgGluArgGlyAsnProGln
TGACTACTGTTCAACCAAGTAGTCAATGGCCTTGTCACCTGGAAGAAATATTCGGACG
yAspTyrCysSerProSerSerGlnTrpProCysAlaProGlyArgLysTyrPheGlyAr
AGGCCCAATCCAAATTTCACAGTAAGCTACATAAATCTATATATGCTAAATTTGATGAA
gGlyProIleGlnIleSerHis
=====
CTTGTAGTGTCTAATTACGTGTATTTTGACATTTCAAAACAGCAACTACAATAATGGGCC
=====
ATGTGGAAGAGCCATCGGAGTGGACCTTTTAAACAATCCTGATTAGTACCCACAGACCC
oCysGlyArgAlaIleGlyValAspLeuLeuAsnProAspLeuValAlaThrAspPr

```

FIGURE 4 : Séquence codante du gène chimérique encadrée par les sites
(suite 1) BamHI et SacI, et séquence d'acides aminés déduite.

===== : intron

14/17

AGTCATCTCATTCAGAGACTGCTATCTGGTTCTGGATGACCCCTCAATCACCAGCCCTTC
 oValIleSerPheLysThrAlaIleLeuTrpPheTrpMetThrProGlnSerProLysProSe
 TTGCCACGATGTCAATTCGAAGATCGAACCCTCTGCCGGTGACCCGATCAGCCAATCG
 rCysHisAspValIleIleGlyArgTrpAsnProSerAlaGlyAspArgSerAlaAsnAr
 TCTTCTCGGATTGGTGTCAATCACAACATCATCAATGGGGCCTCGAATGTGCTCGTGG
 gLeuProGlyPheGlyValIleThrAsnIleIleAsnGlyGlyLeuGluCysGlyArgGCl
 CAATGACAAATAGGGTCCAGGATCGCATTGGGTTTACAGGAGGTATTGCCGATTCTTGG
 yAsnAspAsnArgValGlnAspArgIleGlyPheTyArgArgTyrcysGlyIleLeuGl
 TGTTAGTCCCTGGTGACAAATCTTGATTGCCGGAACCAAGAGATCTTTTGAAACGGACTTTT
 yValSerProGlyAspAsnLeuAspCysGlyAsnGlnArgSerPheGlyAsnGlyLeuLe
 AGTCGATACTATGTAATGAGCTC
 uValAspThrMetEndend ↑ SacI

FIGURE 4 : Séquence codante du gène chimérique encadrée par les sites
 (suite 2) BamHI et SacI, et séquence d'acides aminés déduite.

~~~~~ : intron

15/17

AAGCTTGCAC GACACACTTG TCTACTCCAA AAATATCAAA GATACAGTCC  
TCAGAAGACC AAAGGGCCAA TTGAGACTTT TCAACAAAGG GTAATATCCG  
GAAACCTCCT CGGATTCCAT TGCCCAGCTA TCTGTCACTT TATTGTGAAG  
ATAGTGGAAA AGGAAGGTGG CTCCTACAAA TGCCATCATT GCGATAAAGG  
AAAGGCCATC GTTGAAGATG CCTCTGCCGA CAGTGGTCCC AAAGATGGAC  
CCCCACCCAC GAGGAGCATC GTGGAAAAAG AAGACGTTCC AACCACGTCT  
TCAAAGCAAG TGGATTGATG TGATATCTCC ACTGACGTAA GGGATGACGC  
ACAATCCCAC TATCCTTCGC AAGACCCTTC CTCTATATAA GGAAGTTCAT  
TTCATTTGGA GAGAACACGG GGGACTCTAG AGGATCCATG AGGCGAACTT  
CTAAATTGAC TACTTTTTCT TTGCTGTTTT CTCTGGTTTT GCTGAGTGCT  
GCCTTGGCAC AGAATTGTGG TTCACAGGGC GGAGGCAAAG TTTGTGCGTC  
GGGACAATGT TGCAGCAAAT TCGGGTGGTG CGSTAACACT AATGACCATT  
GTGGTTCTGG CAATTGTCAA AGTCAGTGTC CAGGTGGCGG CCCTGGTCCT  
GGTCCTGTTA CTGGTGGGGA CCTCGGAAGC GTCATCTCAA ATTCTATGTT  
TGATCAAATG CTTAAGCATC GTAACGAAAA TTCTTGTCOA GGAAAGAATA  
ATTTCTACAG TTACAATGCC TTTATTACTG CTGCTAGGTC TTTTCCTGGC  
TTTGGTACAA GTGGTCATAT CAATGCCCGT AAAAGGGAAA TTGCTGCTTT

**FIGURE.5 :** Séquence du gène chimérique complet.

16/17

CTTTGCCCAA ACCTCCCATG AAAC TACTGG TATGTGTATA ACCATTCACA  
TCGAACCATT AAAATATAAT TTCATTTTAT TTTATTTAGT AATTGATTAT  
ATATGTAGGA GGATGGCCTT CCGCACCTGA TGGACCATTG GCATGGGGTT  
ACTGTTTCCT TAGAGAACGA GGTAACCCCG GTGACTACTG TTCACCAAGT  
AGTCAATGGC CTTGTGCACC TGGAAGGAAA TATTTCCGAC GAGGCCCAAT  
CCAAATTTCA CAGTAAGCTA CATAAATCTA TATATGGTAA AATTTGATGA  
ACTTG TAGTG TCTAATTACG TGTATTTTGA CATTTCAAAA CAGCAACTAC  
AACTATGGGC CATGTGGAAG AGCCATCGGA GTGGACCTTT TAAACAATCC  
TGATTTAGTA GCCACAGACC CAGTCATCTC ATTCAAGACT GCTATCTGGT  
TCTGGATGAC CCCTCAATCA CCAAAGCCTT CTTGCCACGA TGTCATCATT  
GGAAGATGGA ACCCATCTGC CGGTGACCGA TCAGCCAATC GTCTTCCTGG  
ATTTGGTGTC ATCACAAACA TCATCAATGG GGGCCTGGAA TGTGGTCGTG  
GCAATGACAA TAGGGTCCAG GATCGCATTG GGTTTTACAG GAGGTATTGC  
GGTATTCTTG GTGTTAGTCC TGGTGACAAT CTTGATTGCG GAAACCAGAG  
ATCTTTTGGG AACGGACTTT TAGTCGATAC TATGTAATGA GCTCGAATTT  
CCCCGATCGT TCAAACATTT GGCAATAAAG TTTCTTAAGA TTGAATCCTG  
TTGCCGGTCT TGGGATGATT ATCATATAAT TTCTGTTGAA TTACGTTAAG  
CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACG TTATTTATGA GATGGGTTTT  
TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACGCGATA GAAAACAAAA  
TATAGCGCGC AAAC TAGGAT AAATTATCGC GCGCGGTGTC ATCTATGTGA  
CTAGATCGAA TTC

**FIGURE.5** : Séquence du gène chimérique complet.  
(suite 1)

17/17

GlyGlyAspLeuGly

SerValIleSerAsnSerMetPheAspGlnMetLeuLysHisArgAsnGluAsnSerCys  
GlnGlyLysAsnAsnPheTyrSerTyrAsnAlaPheIleThrAlaAlaArgSerPhePro  
GlyPheGlyThrSerGlyAspIleAsnAlaArgLysArgGluIleAlaAlaPhePheAla  
GlnThrSerHisGluThrThrGlyGlyTrpProSerAlaProAspGlyProPheAlaTrp  
GlyTyrCysPheLeuArgGluArgGlyAsnProGlyAspTyrCysSerProSerSerGln  
TrpProCysAlaProGlyArgLysTyrPheGlyArgGlyProIleGlnIleSerHisAsn  
TyrAsnTyrGlyProCysGlyArgAlaIleGlyValAspLeuLeuAsnAsnProAspLeu  
ValAlaThrAspProValIleSerPheLysThrAlaIleTrpPheTrpMetThrProGln  
SerProLysProSerCysHisAspValIleIleGlyArgTrpAsnProSerAlaGlyAsp  
ArgSerAlaAsnArgLeuProGlyPheGlyValIleThrAsnIleIleAsnGlyGlyLeu  
GluCysGlyArgGlyAsnAspAsnArgValGlnAspArgIleGlyPheTyrArgArgTyr  
CysGlyIleLeuGlyValSerProGlyAspAsnLeuAspCysGlyAsnGlnArgSerPhe  
GlyAsnGlyLeuLeuValAspThrMet

**FIGURE.6:** Séquence de l'endochitinase recombinante mature.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 91/00607

**I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER** (If several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.<sup>5</sup> C12N 15/56; C12N 15/82; C12N 9/24; C12N 5/10

**II. FIELDS SEARCHED**

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

| Classification System | Classification Symbols |
|-----------------------|------------------------|
|-----------------------|------------------------|

|                       |                  |
|-----------------------|------------------|
| Int. Cl. <sup>5</sup> | C12N; A01H; A01N |
|-----------------------|------------------|

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

**III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT \***

| Category * | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>                                                                                                                                                    | Relevant to Claim No. <sup>13</sup> |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| A          | WO, A, 9007001 (DU PONT) 28 June 1990<br>see the whole document                                                                                                                                                                                                   | 1-19                                |
| A          | PLANT MOL. BIOL. volume 14, 1990, pages 357 - 368;<br>SHISHI H., ET.AL.: 'Strucure of a tobacco<br>endochitinase gene: evidence that different<br>chitinase genes can arise by transposition of<br>sequences encoding a cysteine-rich domain '<br>see figures 3,5 | 1-19                                |
| A          | PASCAL ABREGE NO. 88-0108006 , DURAND-TARDIF,<br>M.: 'Etude de l'induction, par l'etephon,<br>de l'expression du gene codant pour la<br>chitinase chez la tomate et analyse.... '<br>see the whole document                                                       | 1-19                                |
|            | -/.-                                                                                                                                                                                                                                                              |                                     |

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

**IV. CERTIFICATION**

Date of the Actual Completion of the International Search

23 October 1991 (23.10.91)

Date of Mailing of this International Search Report

13 November 1991 (13.11.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) |                                                                                                                                                                                                                                                       |                      |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Category *                                                                 | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                    | Relevant to Claim No |
| A                                                                          | EP, A, 292435 (CIBA-GEIGY) 23 November 1988<br>see example 16                                                                                                                                                                                         | 1-19                 |
| A                                                                          | MOL. PLANT-MICROB. INTERACT. volume 3, No. 4, 1990,<br>pages 252 - 258; LINTHORST H. J. M., ET AL.:<br>'Analysis of acid and basic chitinases from<br>tobacco and petunia and their constitutive<br>expression in transgenic tobacco'<br>see page 256 | 8-19                 |
|                                                                            | -----                                                                                                                                                                                                                                                 |                      |

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9100607  
SA 49660

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

23/10/91

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| -----                                     | -----               | -----                      | -----               |
| WO-A-9007001                              | 28-06-90            | AU-A- 4828490              | 10-07-90            |
| EP-A-292435                               | 23-11-88            | JP-A- 1063373              | 09-03-89            |
|                                           |                     | ZA-A- 8803552              | 21-11-88            |
| -----                                     | -----               | -----                      | -----               |

EPO F 811 007

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00607

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/56 ; C12N15/82 ; C12N9/24 ; C12N5/10

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

C12N ; A01H ; A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté<sup>9</sup>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

| Catégorie <sup>*</sup> | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>2</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>                                                                                                                                                          | No. des revendications visées <sup>14</sup> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| A                      | WO,A,9 007 001 (DU PONT) 28 Juin 1990<br>voir le document en entier<br>---                                                                                                                                                                                                      | 1-19                                        |
| A                      | PLANT MOL. BIOL.<br>vol. 14, 1990,<br>pages 357 - 368;<br>SHISHI H., ET. AL.: 'Structure of a tobacco<br>endochitinase gene: evidence that different<br>chitinase genes can arise by transposition of<br>sequences encoding a cysteine-rich domain '<br>voir figures 3,5<br>--- | 1-19                                        |
| A                      | PASCAL ABREGE NO. 88-0108006<br>DURAND-TARDIF, M.: 'Etude de l'induction, par<br>l'etephon, de l'expression du gene codant pour<br>la chitinase chez la tomate et analyse.... '<br>voir le document en entier<br>---<br>-/-                                                     | 1-19                                        |

<sup>\*</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup><sup>"A"</sup> document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<sup>"E"</sup> document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<sup>"L"</sup> document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)<sup>"O"</sup> document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens<sup>"P"</sup> document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée<sup>"T"</sup> document antérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<sup>"X"</sup> document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive<sup>"Y"</sup> document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.<sup>"Z"</sup> document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 OCTOBRE 1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13. 11. 91

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

MADDOX A.D.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>(SUITE DES RECHERCHES INDIGNEES SUR LA  
DEUXIEME FEUILLE)

| Catégorie ° | Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire<br>des passages pertinents <sup>17</sup>                                                                                                                                         | No. des revendications<br>visées <sup>18</sup> |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| A           | EP,A,292 435 (CIBA-GEIGY) 23 Novembre 1988<br>voir exemple 16<br>---                                                                                                                                                                                              | 1-19                                           |
| A           | MOL.PLANT-MICROB. INTERACT.<br>vol. 3, no. 4, 1990,<br>pages 252 - 258;<br>LINTHORST H. J. M., ET.AL.: 'Analysis of acid and<br>basic chitinases from tobacco and petunia and<br>their constitutive expression in transgenic<br>tobacco '<br>voir page 256<br>--- | 8-19                                           |

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9100607  
SA 49660

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

23/10/91

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO-A-9007001                                    | 28-06-90               | AU-A- 4828490                           | 10-07-90               |
| EP-A-292435                                     | 23-11-88               | JP-A- 1063373                           | 09-03-89               |
|                                                 |                        | ZA-A- 8803552                           | 21-11-88               |

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**